REAKTIVITÄT von GLUTATHIONPEROXIDASE mit LIPIDHYDROPEROXIDEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Adelbert Grossmann

aus Berlin

1983

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547620_0057

REAKTIVITÄT
von
GLUTATHIONPEROXIDASE
mit
LIPIDHYDROPEROXIDEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Adelbert Grossmann

aus Berlin

1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 12. 4. 1983

Dekan: Prof. Dr. Joachim Strähle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Albrecht Wendel
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Weser

Abstract

Grossmann, Adelbert

Reaktivität von Glutathionperoxidase mit Lipidhydroperoxiden

Die selenhaltige Glutathionperoxidase (E.C. 1.11.1.9.) reduziert sehr verschiedenartige Hydroperoxide zu den entsprechenden Hydroxiverbindungen. Deshalb wurde diesem Enzym eine wichtige Schutzfunktion für biologische Membranen zugesprochen: In der Membran entstehende Hydroperoxilipide, die Anlaß zu schweren Membranschädigungen geben können, sollten durch Glutathionperoxidase unschädlich gemacht werden können.

Glutathionperoxidase wurde aus Rindererythrozyten isoliert. Nach Abtrennung des Hämoglobins durch Lösungsmittelfällung erfolgte die weitere Anreicherung durch Phosphatfällung und hydrophobe, Ionenaustausch- und Molekularsiebchromatographie. Das verwendete Enzym war nach 8 000 facher Anreicherung homogen, hatte eine spezifische Aktivität von über 750 U/mg und wurde in einer Ausbeute von über 15% erhalten.

Ob Phospholipid als Hauptlipidkomponente biologischer Membranen nach Hydroperoxidation ein Substrat der Glutathionperoxidase darstellt, wurde wie folgt geprüft: Phospholipide mit hohem Linolsäuregehalt wurden mit Sojabohnen-Lipoxigenase (E.C. 1.13.11.12.) hydroperoxidiert und danach in einem wäßrigen System, das Glutathion, Glutationreduktase (E.C. 1.6.4.2.) und NADPH enthielt, mit reiner Glutathionperoxidase behandelt. Der erwartete NADPH-Umsatz wurde jedoch erst nach Freisetzung der hydroperoxidierten Linolsäure mit Pankreas-Phospholipase A_2 (E.C. 3.1.1.4.) beobachtet.

Die Lipoxigenasereaktion wurde über den Sauerstoffverbrauch und über die Bildung des bei 234 nm absorbierenden Dienproduktes verfolgt. Hydroperoxide wurden außerdem nach Dünnschichtchromatographie mit der Kaliumjodid-Stärke-Reaktion nachgewiesen. Die Vollständigkeit der Phospholipasereaktion wurde dünnschichtchromatographisch geprüft.

Aus den erhaltenen Ergebnissen wird gefolgert, daß die selenhaltige Glutationperoxidase membrangebundene Hydroperoxifettsäuren nicht reduzieren kann und deshalb zumindest in diesem Zusammenhang keinen Membranschutzfaktor darstellt.

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Wendel am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. A. Wendel danke ich für seine große Geduld und seine großzügige Unterstützung bei allen apparativen Problemen. Nicht allein seine fachliche Unterstützung hatte maßgeblichen Anteil am Gelingen der Arbeit.

Besonderen Dank schulde ich Frl. Martina Fausel, Frau Dr. Sylvia Feuerstein, Herrn Dipl. Biochem. Rudolf Reiter und Herrn Dr. Peter Cikryt für oft selbstlose Mitarbeit und wichtige Diskussionen sowie allen übrigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für ihre Kooperativität und ihr Interesse.

Zu großem Dank bin ich verpflichtet:
Herrn Feinmechanikermeister E. Eichele und seinen Mitarbeitern in der feinmechanischen Werkstatt des Institutes für stete Hilfsbereitschaft bei Geräteproblemen und für die hervorragende Anfertigung von Spezialkonstruktionen,
Herrn Dipl. Biochem. Rudolf Reiter für die Durchführung der Fettsäurebestimmung,
Frl. cand. biochem. Christin Kleinwächter für Vorversuche zur Lipoxigenase-Isolierung und
inzwischen zahllosen Helfern bei der Glutathionperoxidase-Präparation.

Holzhacken ist deswegen
so beliebt, weil man
bei dieser Tätigkeit
den Erfolg sofort sieht.

Albert Einstein

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Glutathionperoxidase, ein Selenoenzym	1
1.2.	Vorkommen und Charakterisierung der Glutathionperoxidase	2
1.3.	Zur physiologischen Bedeutung der Glutathionperoxidase	3
1.3.1.	Wasserstoffperoxidstoffwechsel	3
1.3.2.	Abbau anderer wasserlöslicher Hydroperoxide	5
1.3.3.	Membranschutz	7
2.	ZIELSETZUNG	11
3.	MATERIALIEN und METHODEN	12
3.1.	Materialien	12
3.1.1.	Chemikalien	12
3.1.2.	Chemikalien und Enzyme	13
3.2.	Methoden	14
3.2.1.	Isolierung der Glutathionperoxidase	14
3.2.1.1.	Aktivitätsbestimmung	14
3.2.1.2.	Proteinbestimmung	14
3.2.1.3.	Enzymreinigung	15
3.2.1.4.	Reinheitskriterien	16
3.2.2.	Anreicherung der Lipoxigenase	17
3.2.2.1.	Aktivitätsbestimmung	17
3.2.2.2.	Proteinbestimmung	18
3.2.2.3.	Anreicherung des Enzyms	18
3.2.2.4.	Reinheitskriterien	18

4.2.	Anreicherung der Lipoxigenase	29
4.2.1.	Aktivitätsbestimmung	29
4.2.2.	Anreicherung des Enzyms	29
4.2.3.	Reinheitskriterien	31
4.3.	Lipidextraktion	31
4.3.1.	Extraktion von Hydroperoxilinolsäure	31
4.3.2.	Extraktion von Lecithin und Lysolecithin	31
4.4.	Phosphatbestimmung	33
4.5.	Prüfung der Phospholipide auf freie Fettsäuren	33
4.6.	Fettsäuremuster von Rinderherz-Cardiolipin	33
4.7.	Ansätze zur Prüfung Lipoxigenase-behandelter Lipide auf ihre Substrateigenschaft für Glutathionperoxidase	33
4.7.1.	Ansätze mit Linolsäure	33
4.7.2.	Ansätze mit Phospholipiden ohne Phospholipase-Behandlung	35
4.7.3.	Phospholipidansätze mit Phospholipase-Behandlung	35
4.7.3.1.	Ansätze mit Dilinoleoyllecithin	35
4.7.3.2.	Ansätze mit Cardiolipin	40
5.	DISKUSSION	42
5.1.	Isolierung der Glutathionperoxidase	42
5.1.1.	Enzymreinigung	42
5.1.2.	Reinheitskriterien	44
5.1.3.	Enzymalterung	44
5.2.	Anreicherung der Lipoxigenase	44
5.2.1.	Anreicherung des Enzyms	44
5.2.2.	Aktivitätsbestimmung	45
5.3.	Lipidextraktion	45

3.2.3.	Lipidextraktion	18
3.2.3.1.	Extraktion von Hydroperoxilinolsäure	19
3.2.3.2.	Extraktion von Lecithin und Lysolecithin	19
3.2.3.3.	Extraktion von Linolsäure, Phospho- und Lysophospholipiden sowie den jeweiligen Hydroperoxi- und Hydroxiderivaten	20
3.2.4.	UV-Spektrometrie	20
3.2.5.	Phosphatbestimmung	21
3.2.6.	Bestimmung des Fettsäuremusters von Rinderherz-Cardiolipin	21
3.2.7.	Hochauflösende Dünnschichtchromatographie (HPDC)	22
3.2.7.1.	Probenauftrag und Entwicklung der Platten	22
3.2.7.2.	Färbemethoden	23
3.2.7.3.	Prüfung der Phospholipide auf freie Fettsäuren	23
3.2.7.4.	HPDC der mit Lipoxigenase, Glutathion-peroxidase und Phospholipase A_2 behandelten Lipide	23
3.2.8.	Ansätze zur Prüfung Lipoxigenase-behandelter Lipide auf ihre Substrateigenschaft für Glutathionperoxidase	24
3.2.8.1.	Ansätze mit Linolsäure	24
3.2.8.2.	Ansätze mit Phospholipiden ohne Phospholipase-Behandlung	25
3.2.8.3.	Phospholipidansätze mit Phospholipase-Behandlung	25
4.	ERGEBNISSE	
4.1.	Isolierung der Glutathionperoxidase	27
4.1.1.	Enzymreinigung	27
4.1.2.	Reinheitskriterien	27

5.4.	Hochauflösende Dünnschichtchromatographie (HPDC)	46
5.5.	Ansätze zur Prüfung Lipoxigenase-behandelter Lipide auf ihre Substrateigenschaft für Glutathionperoxidase	48
5.5.1.	Methodisches	48
5.5.1.1.	Phospholipiddispersionen in wäßrigen Systemen	48
5.5.1.2.	Lipidhydroperoxidierung	49
5.5.1.3.	Lipoxigenase-Inaktivierung	49
5.5.1.4.	Phospholipase-Behandlung	49
5.5.2.	Ansätze mit Linolsäure	50
5.5.3.	Ansätze mit Phospholipiden	51
5.5.3.1.	Hydroperoxidierung der Phospholipide	51
5.5.3.2.	Behandlung hydroperoxidierter Phospholipide mit Glutathionperoxidase	51
5.5.3.3.	Phospholipase-Behandlung der hydroperoxidierten Phospholipide	52
5.5.3.4.	Lipoxigenase-Behandlung der Phospholipase-behandelten Phospholipide	52
5.5.4.	Ansatz eines kontinuierlichen photometrischen Phospholipase-A_2-Tests	53
5.6.	Glutathionperoxidase als Membranschutzfaktor	55
6.	ZUSAMMENFASSUNG	55
	Literatur	56

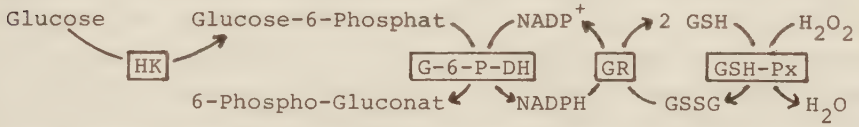
Verwendete Abkürzungen

B-Puffer	0,1 M Kaliumboratbuffer, pH 8.0
CL	Rinderherz-Cardiolipin
DC	Dünnschichtchromatographie
Disk-Elektrophorese	Diskontinuierliche Elektrophorese
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion, reduziert
GSH-Px	Glutathionperoxidase (selenhaltig)
GSSG	Glutathion, oxidiert
HPDC	Hochauflösende Dünnschichtchromatographie
KJ	Kaliumjodid
K_M	Michaeliskonstante
LPO	Lipidperoxidation
Na-DOC	Natriumdesoxycholat
$NADP^+$	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, oxidiert
NADPH	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat, reduziert
Non-Se GSH-Px	Selen-freie Glutationperoxidase
PC	L-α-Dilinoleoyllecithin
ROOH	Hydroperoxid
SDS	Natriumdodecylsulfat
t-BHP	tertiäres Butylhydroperoxid
V_{Max}	Maximalgeschwindigkeit
v/v	Volumenteile je Volumenteile

1. EINLEITUNG

1.1. Glutathionperoxidase, ein Selenoenzym

Im Jahre 1957 entdeckte MILLS in Rinder- und Rattenerythrozyten ein Enzym, das auf Kosten von reduziertem Glutathion (GSH) H_2O_2 zersetzt [1]. Die Aktivität dieses Enzyms war von der Regeneration des oxidierten Glutathions (GSSG) abhängig, die z.B. mit Glucose erreicht werden konnte [2] (s. Abb. 1).



(HK = Hexokinase, G-6-P-DH = Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, GR = Glutathionreduktase, GSH-Px = Glutathionperoxidase)

Abbildung 1: Bereitstellung von reduziertem Glutathion (GSH) für die Glutathionperoxidasereaktion über die Glucoseverwertung.

Diese Glutathionperoxidase (GSH-Px) konnte ebenso wie Katalase den oxidativen Hämoglobinabbau verhindern [2].

Ebenfalls 1957 entdeckten SCHWARZ und FOLTZ [3] sowie die Arbeitsgruppe SCOTT [4], daß Selen ein essentielles Spurenelement ist. Die Autoren konnten zeigen, daß eine ernährungsbedingte Lebernekrose in Ratten [3] und exsudative Diathese bei Hühnchen [4] gleichermaßen durch Selen und Vitamin E verhindert werden konnten.

TAPPEL, der an der peroxidativen Schädigung von Biomembranen arbeitete, zeigte 1965, daß experimentell erzeugte Lipidperoxidation durch Selen und Vitamin E gehemmt werden konnte [5]. 1968 wiesen LITTLE und O'BRIEN nach, daß GSH-Px nicht nur H_2O_2, sondern auch Cumol- und tert.-Butylhydroperoxid sowie die physiologisch relevanten Hydroperoxide von Linolsäure und Linolensäuremethylester (allgemein: ROOH) in strenger Stöchiometrie mit GSH umsetzt [6]. Aus dieser Zeit stammen auch die ersten Befunde, daß Selen und Vitamin E unterschiedliche Funktionen im Organismus haben [7,8].

ROTRUCK et al. zeigten 1971, daß Erythrozyten aus Selen-adäquaten Ratten nur in Gegenwart von Glucose hämolysebeständig sind, während Vitamin E die Erythrozytenmembran unabhängig vom Selen- und Glucosestatus schützt [9]. Dagegen hat dieses Vitamin auf die Hämoglobinoxidation [2] keinen Einfluß [10]. Die Bedeutung des Selens wurde deshalb von den Autoren innerhalb der in Abbildung 1 gezeigten Stoffwechselkette vermutet [10]. Weitere Experimente bewiesen schließlich, daß Selen ein integraler Bestandteil der GSH-Px ist [11]. FLOHÉ et al. zeigten kurze Zeit später den stöchiometrischen Gehalt von 4 Mol Selen je Mol hochreinen Enzyms auf [12]. Inzwischen wurde in den Arbeitsgruppen TAPPEL [13] und WENDEL [14] die Natur der Selenkomponente als Selenocystein wahrscheinlich [15] gemacht.

1.2. Vorkommen und Charakterisierung der Glutathionperoxidase

GSH-Px scheint bei höheren Tieren ein ubiquitäres Enzym zu sein, denn sie ließ sich in allen bisher untersuchten Geweben nachweisen [16,17]. Die höchsten Aktivitäten findet man in Leber, Nebenniere und Milz [17]. Große Speziesunterschiede wurden für den Leber- [17] und Erythrozytengehalt [16] an GSH-Px aufgezeigt. Die subzelluläre Verteilung wurde in der Rattenleber [18] genau [19] untersucht; demnach befinden sich etwa 70% der Aktivität im Cytosol und die übrigen etwa 30% in der Mitochondrienmatrix [19].

GSH-Px katalysiert die stöchiometrische Reduktion von H_2O_2 mit GSH [1]:

$$H_2O_2 + 2\ GSH \longrightarrow H_2O + GSSG$$

Ebenso stöchiometrisch erfolgt die Reduktion anderer Hydroperoxide [6]. Während GSH-Px für den Elektronendonor GSH hochspezifisch ist [20], reagiert sie mit fast [21,22] allen angebotenen Hydroperoxiden, z.B. auch mit Steroid- und Nucleinsäurehydroperoxiden (Zusammenstellungen in Lit. 22 und 23).

GSH-Px wurde aus Rindererythrozyten [24] und vielen anderen Quellen z.T. bis zur Homogenität (vgl. Lit. 25) isoliert [16]. Sie hat ein mittleres Molekulargewicht von etwa 85 000 D und besteht aus 4 wahrscheinlich identischen Untereinheiten [16,26]. Die Röntgenstrukturanalyse des Rindererythrozytenenzyms zeigte, daß Selenocystein in die Peptidkette integriert ist [26].

Die kinetische Untersuchung des Rindererythrozytenenzyms im Arbeitskreis FLOHÉ [27,28] zeigte, daß dieses Enzym nach einem Ping-Pong-Mechanismus reagiert, in dem Enzym-Substrat-Komplexe kinetisch nicht faßbar sind. Eine gleichzeitige Sättigung der GSH-Px mit beiden Substraten ist nicht zu erreichen, es kann jedoch Hydroperoxidsättigung bei konstanter GSH-Konzentration erzielt werden. Die Natur des Hydroperoxids spielt nur für die Sättigungskonzentration, kaum aber für den Gesamtumsatz eine Rolle, da eine der GSH-abhängigen Teilreaktionen geschwindigkeitsbestimmend ist. Die Umsatzrate mit H_2O_2 entspricht der der Katalase (etwa $10^8 \cdot M^{-1} \cdot sec^{-1}$); andere Hydroperoxide werden - entsprechend ihrer relativen Spontanreaktivität mit GSH - langsamer umgesetzt.

Das cytosolische Rattenleberenzym hat vergleichbare kinetische Eigenschaften [29], während GSH-Px aus Schweineblut eine GSH-Sättigung (K_M etwa 3 mM) zeigt [30]. MORISSEY und O'BRIEN wiesen verschiedene Mechanismen für das Ratten- und Kaninchenleberenzym für unterschiedliche GSH-Konzentrationen nach [31].

1.3. Zur physiologischen Bedeutung der Glutathionperoxidase

1.3.1. Wasserstoffperoxidstoffwechsel

H_2O_2 ist ein physiologisches Stoffwechselprodukt [32-34] und für sich allein selbst im millimolaren Konzentrationsbereich z.B. für Mitochondrien offensichtlich unschädlich [33,35]. In Gegenwart von Radikalen (z.B. Superoxid) kann es dagegen Anlaß zu einer Radikalkettenreaktion und auch zur Lipidperoxidation geben [33,36]. Für die Beseitigung des H_2O_2 stehen der Zelle zwei sehr effektive Enzymsysteme zur Verfügung: Katalase und GSH-Px (letz-

tere zusammen mit dem GSSG-reduzierenden System). In der Rattenleberzelle sind diese beiden Systeme durch Kompartimentierung getrennt: Die GSH-Px ist nur im Cytosol und in der Mitochondrienmatrix nachweisbar [19], die Katalase befindet sich wohl nur in den Peroxisomen [33;19]. Unter physiologischen Stoffwechselbedingungen reicht die Kapazität der Katalase für den Abbau des im Peroxisomenstoffwechsel [32] anfallenden H_2O_2 völlig aus [33,37]. Ebenso beseitigt das GSH-Px-System das vor allem aus Organellmembranen stammende H_2O_2 [34] problemlos [33,37]. Erst bei Überlastung eines Systems tritt H_2O_2 durch die Organellmembran durch und wird dann vom anderen System erfaßt [37]. Durch diese beiden Systeme wird die H_2O_2-Konzentration im normalen Zellstoffwechsel unter 10^{-7} M [38] gehalten [33].

Neuere Untersuchungen an Fettgewebszellen der Ratte lassen die Vermutung aufkommen, daß zumindest in diesen Zellen dem H_2O_2 eine Art "second messenger"-Funktion zukommt [39]. MAY konnte eine direkte, von Glucose unabhängige Stimulierung des Pentosephosphatweges durch Insulin zeigen. Schlüsselenzym dieses Stoffwechselweges ist die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (s. Abbildung 1, S. 1), die durch NADPH gehemmt und durch $NADP^+$ und GSSG aktiviert wird [40,39]. Insulin kann eine in der Plasmamembran lokalisierte NADPH-Oxidase aktivieren [41], deren Reaktionsprodukt H_2O_2 über die Reaktionen von GSH-Px und Glutathionreduktase die Bildung der beiden Aktivatoren veranlaßt [39]. Dies bedeutet, daß die GSH-Px eine Rolle bei der hormonellen Steuerung des Zellstoffwechsels spielen könnte.

Die Erythrozyten enthalten Katalase und GSH-Px, sie sind aber nicht kompartimentiert [33]. Da beide Enzyme H_2O_2 etwa mit der gleichen Geschwindigkeit umsetzen [27], hängt ihre Bedeutung für den H_2O_2-Abbau nur von ihrer Konzentration ab [42]. Der Pentosephosphatweg, das einzige NADPH-regenerierende System im Erythrozyten [33], wird ähnlich wie in anderen Zellen durch $NADP^+$ und GSSG aktiviert (vgl. Lit. 39).

H_2O_2 oxidiert Hämoglobin zu Methämoglobin [43] und führt weiterhin zum Abbau des Hämoglobins [1,2]. Auch im genetisch bedingten

Katalasemangel ist der H_2O_2-Abbau im Menschen bei Belastung bis knapp 10^{-5}M durch das GSH-Px-System gewährleistet [43]. Unter normalen Bedingungen fallen Katalasemangelindividuen klinisch überhaupt nicht auf [43], während eine Schwachstelle im GSH-Px-System [42] ebenso wie Selenmangel [9] die Hämolyseanfällgikeit der Erythrozyten eindeutig erhöht. Offensichtlich kommt also der GSH-Px im Erythrozyten eine über die H_2O_2-Beseitigung hinausreichende Funktion zu.

1.3.2. Abbau anderer wasserlöslicher Hydroperoxide

Die Reaktivität der GSH-Px mit organischen Hydroperoxiden [6,23] konnte auch *in situ* an Erythrozyten [44], an der perfundierten Rattenleber [45] und an isolierten Rattenleberzellen [45] demonstriert werden. Die Arbeitsgruppe SIES [45] konnte zeigen, daß die Belastung der Leber mit Cumol- und tert.-Butylhydroperoxid zwar mit einem GSSG-Austritt in den extrazellulären Raum verbunden ist; Konsequenzen für die Integrität des Organs waren jedoch nicht zu erkennen, solange intrazellulär noch NADPH regeneriert werden konnte. Der auch bei H_2O_2-Belastung zu beobachtende GSSG-Efflux wurde auf die Reaktion der GSH-Px zurückgeführt; er entspricht einem kleinen, aber konstanten Anteil des Umsatzes. Isolierte, d.h. von cytosolischer GSH-Px abgetrennte Rattenlebermikrosomen und -mitochondrien zeigten dagegen bei Hydroperoxidbehandlung erhöhte Sauerstoffaufnahme und Malondialdehydbildung, beides Hinweise auf Lipid-peroxidierende Reaktionen. In isolierten Leberzellen traten diese destruktiven Reaktionen erst nach quantitativer NADPH-Oxidation auf. Diese Versuche zeigen die Gefährlichkeit intrazellulärer Hydroperoxide auf. Ihr Abbau wird offenbar durch GSH-Px bewerkstelligt. Eine zumindest geringe Beteiligung des endoplasmatischen Retikulums an diesem Abbau konnte in diesen Versuchen ebenfalls demonstriert werden [45,46].

Das Auftreten von freien Fettsäurehydroperoxiden in der Zelle auch unter physiologischen Bedingungen wurde bisher zwar nicht

nachgewiesen, ist aber durchaus wahrscheinlich (vgl. Kap. 1.3.3.). Die schädigende Wirkung von Hydroperoxilinolsäure konnte an Erythrozytenmembranen demonstriert werden [47]. Viel länger schon ist bekannt, daß die Glykolyse [48] durch Inaktivierung der Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase [49] und der Citratzyklus durch Inaktivierung der Isocitratdehydrogenase [50] gehemmt wird. Diese ausgewählten Beispiele zeigen, daß die destruktive Wirkung der Hydroperoxide nicht auf Membranen beschränkt ist, und unterstreichen die Notwendigkeit eines Hydroperoxid-metabolisierenden Systems in den wäßrigen Räumen der Zelle.

Unverstanden blieb zunächst der Befund, daß die cytosolische Leberfraktion von Selenmangelratten immer noch Cumolhydroperoxid auf Kosten von GSH abbaut [51]. BURKs Gruppe konnte in dieser Fraktion eine weitere Glutathionperoxidaseaktivität von geringerem Molekulargewicht (39 000 D) nachweisen, die mit verschiedenen Hydroperoxiden, nicht jedoch mit H_2O_2 reagiert [52]. Diese selenfreie "Non-Se GSH-Px" erwies sich als identisch mit einem Teil der schon lange bekannten Glutathion-S-Transferasen [53]. Diese S-Transferasen machen etwa 10% des cytosolischen Rattenleberproteins aus [54] und sind für Konjugationsreaktionen von Fremdstoffen mit GSH zuständig [54,55]. Die großen Unterschiede der Aktivität der beiden Enzyme in verschiedenen Geweben und bei verschiedenen Tierspezies sind aus Lit. 17 ersichtlich.

Der funktionell wichtigste Unterschied zwischen beiden Glutathionperoxidasen ist in ihren kinetischen Konstanten zu sehen: Unter gleichen Bedingungen liegen die K_M- [53,56] oder V_{Max}-Werte [57] deutlich zu Ungunsten des selenfreien Enzyms; nur Cumolhydroperoxid erscheint als geeignetes Substrat [56]. Die Beteiligung beider Enzyme am Hydroperoxidstoffwechsel wurde in Leberperfusionsexperimenten mit Selen-adäquaten und Selenmangel-Ratten nachgewiesen [56]. Dabei wurde im Selenmangel ein signifikanter Anstieg der Non-Se GSH-Px beobachtet [56]. Inzwischen wurde auch der Umsatz von Fettsäure- und Steroidhydroperoxiden durch Non-Se GSH-Px beschrieben [58,57].

Die kinetischen Daten der Mäuseleber-Non-Se GSH-Px lassen eine Beteiligung dieses Enzyms am Fettsäurehydroperoxidstoffwechsel neben dem Selenoenzym kaum vermuten [57]. Da eine unterschiedliche Bedeutung dieser beiden Glutathionperoxidasen in vivo bzw. in situ bisher nicht nachgewiesen werden konnte, muß man wohl eher eine Kooperation der beiden Systeme annehmen, wie auch die Induktion der Non-Se GSH-Px im Selenmangel [56] vermuten läßt [59].

Arachidonsäure nimmt unter den Fettsäuren eine Sonderstellung ein, da sie durch verschiedene hochspezifische Lipoxigenasen peroxidiert und anschließend zu hochwirksamen Substanzen (Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene, Prostacycline, 12-Hydroxieicosatetraensäure) umgewandelt werden kann. Se-GSH-Px kann in vitro die verschiedenen Hydroperoxide reduzieren und dabei auch regulierend auf die verschiedenen Synthesewege einwirken; über die Bedeutung der GSH-Px am Arachidonsäurestoffwechsel in vivo ist dagegen noch nichts Genaues bekannt [42,59].

1.3.3. Membranschutz

Die meisten Biomembranen sind hauptsächlich aus Proteinen und polaren Lipiden aufgebaut. Beide Membranbestandteile sind nicht beliebig stabil. Besonderes Interesse finden seit langem die Mechanismen, die für den Schutz von Membranlipiden verantwortlich sind [60]. Vor allem hochungesättigte Fettsäuren (RH) können in Gegenwart von verschiedenen Radikalen sehr leicht in Alkylradikale ($R^{\cdot}$) übergehen. Diese reagieren sehr leicht mit Sauerstoff zu Peroxiradikalen ($ROO^{\cdot}$) und letztere mit einem weiteren ungesättigten System zum Hydroperoxid (ROOH). Diese Reaktionsfolge, in die auch Proteine eingeschlossen sein können [61,62], beinhaltet nur einen kleinen Teil der möglichen Radikalreaktionen, die unter dem Begriff "Lipidperoxidation" (LPO) zusammengefaßt werden. Diese Reaktionen laufen innerhalb der hydrophoben Membran ab, sind also von den allermeisten wassergelösten Proteinen abgeschirmt. Schutzfaktoren müssen sich deswegen in der Membran befinden oder Zugang in sie haben.

Schon seit über 20 Jahren ist Vitamin E als Membranschutzfaktor bestätigt. Es reagiert nur mit Radikalen und führt dabei zum Radikalkettenabbruch [60]. Die physiologische Vitamin E-Konzentration (etwa 1 Mol Vitamin E je 1 000 Mol hochungesättigte Fettsäuren [63]) kann durch orale Zufuhr kaum erhöht werden [60]. Sie erwies sich in Modellexperimenten als völlig ausreichend zur Neutralisierung einzelner Radikalereignisse, während bei sehr schneller LPO gar keine Vitamin E-Oxidation beobachtet wird: Offensichtlich reagiert Vitamin E mit Lipidradikalen nur langsam [60]. Mit Hydroperoxiden reagiert Vitamin E in Abwesenheit von Schwermetallionen und Radikalen überhaupt nicht, solange es nicht übermäßig zugesetzt wird [60].

Tatsächlich sind Hydroperoxide unter bestimmten Bedingungen ungewöhnlich stabil: In nicht zu konzentrierter Lösung wurde die Halbwertzeit der homolytischen Spaltung in Alkoxi- (RO·) und Hydroxylradikal zu 27,5 Jahren bestimmt [60]. Da die Hauptbedingung für die Stabilität der Hydroperoxide - Abwesenheit von Schwermetallionen und Radikalen - in vivo sicher nie erfüllt ist, wird die Notwendigkeit Hydroperoxid-metabolisierender Systeme für den Membranschutz erkennbar. Bisher wurden solche Systeme in der Membran noch nicht nachgewiesen; die Schlüsselfrage, ob die bekannten Glutathionperoxidasen ans membrangebundene Hydroperoxid herankommen, ist ebenfalls unbeantwortet [59].

Eine mögliche Antwort auf dieses Problem präsentierten YASUDA und FUJITA: Sie konnten zeigen, daß die endogene Phospholipase A_2 [64] in Rattenlebermitochondrien durch experimentell induzierte LPO deutlich aktiviert wird [65]. Eine reversible, starke Aktivierung des gleichen Enzyms wurde auch im Vitamin E-Mangel nachgewiesen [66]. In der Arbeitsgruppe MEAD konnte gezeigt werden, daß Phospholipid-gebundene Fettsäureepoxide - ebenfalls ein LPO-Produkt - gleichermaßen endogene und zugesetzte Phospholipasen A stark aktiviert [67]. Cytosolische und mikrosomale (!) Epoxidhydrolasen setzten das freie Epoxid erheblich schneller um als das lipidgebundene [67]. Ihren Befund erklärten die Autoren mit einer Auflockerung der Membranstruktur durch das

störende, hydrophile Epoxid [67]. Tatsächlich werden Phospholipasen in Monolayer-Modellsystemen durch eine Verringerung der Packungsdichte der Phospholipide aktiviert [67,68]. Über die Regulation dieser nur z.T. Calcium-abhängigen endogenen Phospholipasen A ist leider noch zu wenig bekannt [64]. Immerhin ist in Rattenlebermitochondrien so viel Phospholipase A_2 enthalten, daß ihr Hauptsubstrat, die Kephalinfraktion (etwa 40% des Gesamtphospholipids [69]), in etwa 30 Minuten vollständig hydrolysiert werden kann [70]. Andererseits ist bekannt, daß die Phospholipid-Fettsäuren einem wesentlich schnelleren turnover unterliegen (1 bis 2 Tage) als die Phospholipidkopfgruppe [71,72]. Als eine Steuergröße für den Fettsäure-turnover wird die Regulation der endogenen Phospholipasen durch die auch unter physiologischen Bedingungen stattfindende LPO vermutet [73].

Eine Bedeutung der endogenen Phospholipasen A für den GSH-Px-abhängigen Hydroperoxidstoffwechsel ist noch nicht bekannt. McCAY et al. gelang es nicht, nach LPO-Hemmung mit Zellsaft plus GSH membrangebundene Hydroxifettsäuren nachzuweisen; die Autoren hatten allerdings auch Probleme bei der Wiederfindung gesättigter Fettsäuren [74]. In unveröffentlichten Versuchen fand TAPPEL mit nicht näher charakterisierten peroxidierten Lecithinvesikeln nur eine geringe GSH-Px-Aktivität [75]. HINKELDEY wies GSH-Px-Aktivität mit verschiedenen peroxidierten Lipiden nach, konnte aber eine Hydrolyse des Lipids nicht ausschließen [76]. Der erste Nachweis von gebundenen Hydroxifettsäuren gelang MITCHELL et al. nach experimentell erzeugter *in vivo*-LPO [77].

Fast alle Versuche, die sich mit der Membranschutzwirkung der GSH-Px befassen, wurden bisher *in vivo* oder mit wenig aufgearbeiteten Zellfraktionen durchgeführt. Seitdem im Cytosol [78-83] und *in* der Mikrosomenmembran [84,85] z.T. GSH-abhängige [79-85] LPO-hemmende Faktoren gefunden wurden, die von beiden Glutathionperoxidasen [80,81,84,85] bzw. zumindest vom Selenoenzym sicher verschieden [79,82,83] sind, müssen diese Protein-

faktoren in die Interpretation der bisher durchgeführten Untersuchungen mit einbezogen werden. Die Wirkung dieser GSH-abhängigen Faktoren scheint dabei Vitamin E-ähnlich zu sein, indem sie unter peroxidierenden Bedingungen das Anlaufen der LPO [79-83] zumindest für eine gewisse Zeitspanne [84,85] völlig [85] unterdrücken. Gleichzeitig wurde mit einem derartigen hochgereinigten Faktor auch eine GSH-Px-artige Aktivität mit Phospholipidhydroperoxiden nachgewiesen [80,81].

Studien im Selenmangel erscheinen isoliert betrachtet inzwischen ebenfalls wenig geeignet, eindeutige Aussagen über die physiologische Funktion der Se-GSH-Px zu erzielen, denn in den vergangenen Jahren wurden immer wieder neue Selenoproteine bei Säugetieren gefunden, deren Funktion noch wenig verstanden ist [86-89]. Von allergrößter Bedeutung ist jedoch der Befund, daß Selenmangelratten bereits wenige Stunden nach Verabreichung von Selen vollständig gegen eine experimentell im Selenmangel induzierbare LPO geschützt waren, obwohl zu diesem Zeitpunkt noch keinerlei Anstieg der Se-GSH-Px-Aktivität nachweisbar war [90].

Diese Fakten machen deutlich, daß die Bedeutung der GSH-Px nicht allein aus *in vivo*-Experimenten abgeleitet werden darf, zumal ein spezifischer Inhibitor dieses Enzyms bisher nicht bekannt ist. *In vitro*-Versuche sind nur mit reinem Enzym sinnvoll. Derartige Versuche wurden letzmalig vor etwa 10 Jahren vom Arbeitskreis FLOHÉ veröffentlicht [91,92]: ZIMMERMANN konnte zeigen, daß reine GSH-Px gereinigte innere Mitochondrienmembranen aus Rattenlebern wirksamer vor LPO schützt als Katalase; dieser Schutz war allerdings unvollkommen (vollkommener Schutz wurde mit Vitamin E erzielt) [92]. Immerhin steht dieses Ergebnis mit den Befunden aus Erythrozyten-Untersuchungen (vgl. Kap. 1.3.1.) in Einklang. Somit ist evident, daß der GSH-Px beim Membranschutz eine Funktion zukommt, die über die Beseitigung von H_2O_2 hinausgeht [59].

2. Z I E L S E T Z U N G

Die nachgewiesene Membranschutzwirkung des Selenoenzyms Glutathionperoxidase [92] in einem wachsenden Kreis anderer Glutathion-abhängiger Membranschutzsysteme ist auf molekularer Ebene immer noch unverstanden. Die bisher bekannte Substratspezifität des Enzyms läßt einen Angriff auf hydroperoxidierte Fettsäureester vermuten. Das Auftreten dieses Zwischenproduktes der peroxidativen Membranschädigung (Lipidperoxidation) ist vor allem in den Membranphospholipiden zu erwarten.

Phospholipide sollten enzymatisch hydroperoxidiert werden. Das Reaktionsprodukt sollte dann in wäßriger Dispersion auf seine Substrateigenschaft für reine Rindererythrozyten-Glutathionperoxidase geprüft werden.

Dieser Modellversuch sollte zur Klärung der Frage beitragen, ob Glutathionperoxidase in biologischen Membranen befindliche Hydroperoxilipide reduzieren kann.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1. Materialien

3.1.1. Geräte

Photometer "Eppendorf" mit thermostatisierbarem Küvettenhalter	Netheler und Hinz, Hamburg
Zeiss-Spektralphotometer PM Q II mit Doppelmonochromator MM 12	Zeiss, Oberkochen
Doppelstrahl-Zweiwellenlängen-Spektrometer UV-300	Shimadzu, Düsseldorf
Hochvakuumpumpe ES 35 mit Diffusionspumpe E 0 1	Edwards, Marburg
Tiefkühltruhe UF 85-300 S	Colora, Lorch
Sauerstoffelektrode YSI 4004, Clark-Typ	Yellow Springs Instrument Co., Ohio, USA
mit Verstärker	Zeissler, Troisdorf
und temperierbarem Reaktionsgefäß	Anfertigung durch Glasbläsermeister H.Kahl, Böblingen
Präparierbox zum Auftragen von Proben für die HPDC unter Schutzgas bei Wasserkühlung	Eigenbau der feinmechanischen Werkstatt des Physiologisch-chemischen Institutes, Tübingen
Horizontale Sandwichkammer für die Entwicklung von HPDC-Platten	
Chromatographierohre und Adapter	
MSE-6L-Zentrifuge "Mistral" mit 6 x 1 l - Ausschwingrotor	Measuring and Scientific Equipment, London, England
Zentrifuge "Servall Superspeed" mit Rotor "SS-34"	Vetter, Wiesloch
Separator	Westfalia Separator AG, Oelde/Westfalen

Fraktionensammler FRAC-300 mit Zweikanalmonitor UV-2, sowie Chromatographiematerialien: Phenylsepharose CL-4 B DEAE-Sephadex A-50 Sephacryl S-300 Superfine	Pharmacia GmbH, Freiburg
Hohlfaserkonzentratoren	Berghof, Tübingen
Elektrophoreseapparatur LKB 2001 mit Stromversorgung LKB 2002	LKB Instrument GmbH, Gräfelfing

Alle übrigen verwendeten Geräte entstammten der üblichen Laborausrüstung.

3.1.2. Chemikalien und Enzyme

Reinststickstoff 99,99%ig	Messer-Griesheim GmbH, Düsseldorf
Glutathion reduziert Glutathionreduktase NADPH Phospholipase A_2	Boehringer, Mannheim GmbH, Mannheim
Acrylamid N,N'-Methylenbisacrylamid N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin Ammoniumpersulfat Coomassie Brilliant Blue G-250 Natriumdodecylsulfat 1,2-Dilinoleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholin = L-α-Dilinoleoyllecithin Cardiolipin aus Rinderherz Linolsäure Linolsäuremethylester	Serva, Heidelberg
t-Butylhydroperoxid	Peroxidchemie, Höllriegelskreuth

1-Amino-2-Naphthol-4-sulfonsäure	Fluka, Neu-Ulm
Sojabohnenacetonpulver	Sigma, München
Trishydroximethylaminomethan	
Kieselgel-60 HPDC-Platten mit Konzentrierungszone, Nr. 13 748 p.A. Lösungsmittel und alle weiteren Chemikalien	Merck, Darmstadt

3.2. Methoden

3.2.1. Isolierung der Glutathionperoxidase

3.2.1.1. Aktivitätsbestimmung

Die GSH-Px-Aktivität wurde mit einem gekoppelten Testverfahren ermittelt [93,94].

3.2.1.2. Proteinbestimmung

Je nach Reinheit des Enzyms wurde der Proteingehalt nach einer der folgenden Methoden bestimmt:

a) Im Ausgangsmaterial der Präparation (Hämolysat) wurde die Hämoglobinkonzentration nach Drabkin gemessen [93].

b) Nach Abtrennung des Hämoglobins erfolgte die Proteinbestimmung zunächst nach Kalckar [95]:

$E_{280} \times 1{,}45 - E_{260} \times 0{,}74 = \text{mg Protein/ml.}$

Bei weiterer Anreicherung des Enzyms wird praktisch der gleiche Wert erhalten nach:

$E_{280} \times 1 = \text{mg Protein/ml.}$

c) Ab einer Reinheit von 30-50% wurde die Proteinkonzentration über den von FLOHÉ et al. ermittelten Extinktionskoeffizienten der GSH-Px am Absorptionsmaximum bei 280 nm ermittelt [24]:

$E_{280} \times 1{,}35 = \text{mg GSH-Px/ml}$

bzw. $E_{280}^{1\%} = 7{,}41$.

3.2.1.3. Enzymreinigung

Isolierungen der Glutathionperoxidase aus Rindererythrozyten erfolgten nach dem in Lit. [94] angegebenen Schema. Es werden deshalb nur Verbesserungen und Varianten beschrieben, die für die Praxis von Bedeutung sind.

Die Erythrozyten wurden drei- bis viermal gewaschen. Nach dem Zentrifugieren wurde jeweils versucht, mit dem Überstand auch die Leukozyten abzusaugen. Der letzte Waschgang erfolgte in einem Separator, der Medium und Erythrozyten praktisch quantitativ trennt.

Vor der Lösungsmittelfällung und bei allen folgenden Schritten (ausgenommen die Molekularsiebchromatographie) wurde allen Puffern 50 mM Mannit zugesetzt. Alle Puffer enthielten außerdem je 1 mM EDTA und Natriumazid.

Der konzentrierte Überstand der Lösungsmittelfällung wurde in einem Hohlfaserkonzentrator (Hollow fiber, Ausschlußgrenze 50 000 D) kontinuierlich mit etwa 10 Volumina frischem Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Aktivität im kleinstmöglichen Volumen aus der Fiber eluiert.

Zur Phosphatfällung wurde die von der Proteinkonzentration abhängige, minimal benötigte Phosphatkonzentration eingestellt. Spätestens eine halbe Stunde nach der gerade noch tropfenweise erfolgenden Phosphatzugabe wurde zentrifugiert; bis zu einer Phosphatkonzentration von maximal 1,9 M ließ sich das ausgefallene Protein sedimentieren. Der Niederschlag wurde mit wenig Phosphatpuffer (1,6 M bis 1,8 M) zweimal gewaschen, auf pH 8.0 umgepuffert und dann zwei- bis dreimal mit wenig 1,3 M Phosphatpuffer (pH 8.0) gewaschen. Aus dem verbliebenen Niederschlag wurde die GSH-Px mit etwa 1 ml 0,7 M Phosphatpuffer (pH 8.0) je 1 000 U extrahiert. Alle Schritte der Phosphatfällung erfolgten bei Eiskühlung.

Die Phenylsepharose hatte eine Kapazität von über 2 000 U/ml Gelbett. Das beladene Gel wurde auf der Säule mit wenig 0,7 M Phosphat, dann mit etwa 10 Säulenvolumina 0,5 M Phosphat pH 8.0

gewaschen. Anschließend wurde die GSH-Px mit Phosphat-freiem Medium eluiert. Die Flußrate betrug mehr als 60 ml/h.

Die GSH-Px wird in aller Regel im ersten Proteinpeak vom Ionenaustauscher eluiert (vgl. Lit. 25). Diese Chromatographie wurde deshalb auch so durchgeführt, daß das Enzym gerade noch nicht ans Gel gebunden wurde. Hierzu wurde die Ionenstärke erhöht (20 mM Phosphat pH 8.0) und die Gelmenge verringert (etwa 1 g trockenes DEAE-Sephadex je 20 000 U GSH-Px).

Auf jeder Stufe nach der Phosphatfällung kann eine erhebliche Reinigung durch Kristallisieren des Enzyms erzielt werden. Hierzu mußte die Konzentration der GSH-Px auf 3 000 U/ml oder etwas höher eingestellt werden. Diese Lösung wurde so gegen 1,3 M bis 1,4 M Phosphatpuffer pH 7.0 dialysiert, daß die Phosphat-Endkonzentration bei 1,25 M lag.

3.2.1.4. Reinheitskriterien

Der Verlauf der Enzymreinigung wurde anhand der spezifischen Aktivität verfolgt und mit Erfahrungswerten verglichen.

Geprüft wurde die Reinheit der GSH-Px oder die Effektivität einzelner Reinigungsschritte mittels SDS-Disk-Elektrophorese in 10%igem Gel. Die Durchführung erfolgte nach LAEMMLI [96], fixiert und gefärbt wurde nach FAIRBANKS et al. [97].

Die Proben wurden gegen 30 mM Ammoniumacetat pH 7.3 dialysiert, lyophilisiert, in Probenpuffer mit 1% SDS und 5% Mercaptoethanol aufgenommen und dann zwei Minuten bei 100°C inkubiert. Als Referenz diente eine Eichproteinmischung der folgenden Zusammensetzung: Phosphorylase b (92 000 D), Rinderserumalbumin (68 000 D), Pyruvatkinase (57 000 D), Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (36 000 D), Carboanhydrase (30 000 D), α-Chymotrypsinogen A (25 000 D), Trypsin-Inhibitor (21 500 D), β-Lactoglobulin (18 400 D), Myoglobin (17 200 D) und Lysozym (13 400 D). Aufgetragen wurden je 1 bis 2 µg der einzelnen Referenzproteine und 1 bis über 20 µg GSH-Px. Die Elektrophorese wurde unter Wasserkühlung bei konstanter Stromstärke von 40 mA je Gel (20 mA/cm^2; Start bei 20 mA) durchgeführt. Die Spannung stieg

dabei von etwa 80 auf über 500 V an. Die Laufdauer betrug drei bis vier Stunden.

Als weiteres Reinheitskriterium diente das UV-Spektrum des Enzyms. Registriert wurde die Extinktion des Maximums bei 280 nm, die des Minimums bei 250 nm sowie das Verhältnis beider Extinktionswerte. Katalase wurde anhand des Extinktionsmaximums bei 403 nm identifiziert (ε = 115 · mM^{-1} · cm^{-1} je Hämgruppe [98]).

3.2.2. Anreicherung der Lipoxigenase

Lipoxigenase wurde für die enzymatische Hydroperoxidierung verschiedener Lipide benötigt.

3.2.2.1. Aktivitätsbestimmung

Die Lipoxigenaseaktivität wurde photometrisch über die Absorption des entstehenden Dien-Konjugats bei 234 nm oder polarographisch über die Registrierung des Sauerstoffverbrauchs bestimmt.

Der Testansatz war suboptimal (vgl. Lit. 99), aber an den später gewünschten Reaktionsbedingungen (s. 3.2.7.) orientiert. 10 µl zu 23 mM frisch in Äthanol gelöste Linolsäure wurden in 0,99 ml luftgesättigtem Kaliumboratpuffer pH 8.0 (im Folgenden als B-Puffer bezeichnet) suspendiert. Gestartet wurde mit soviel Enzymlösung, daß ein Umsatz von 30-40 nMol je Minute registriert werden konnte. Die Reaktion wurde am Zeiss-Photometer bei Raumtemperatur oder mit der Sauerstoffelektrode bei 25°C verfolgt.

Für die Auswertung der photometrischen Bestimmung wurde ein Extinktionskoeffizient von 25 · mM^{-1} · cm^{-1} angenommen [99].

Die Sauerstoffelektrode wurde bei einer Polarisationsspannung von 0,8 V betrieben. Der Polarisationsstrom wurde nach Verstärkung mit einem Kompensationsschreiber registriert. Die 100%-Eichung erfolgte mit luftgesättigtem Puffer (0,25 mM O_2), als Nullpunkt wurde der elektrische Nullpunkt eingestellt (Nullstrom 0,1% des Vollausschlages).

Als Enzymeinheit wurde der Umsatz von 1 µMol Substrat je Minute definiert [99].

3.2.2.2. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde zunächst nach LOWRY et al. [100], nach der Molekularsiebchromatographie photometrisch ($E_{280}^{1\%} = 14,0$ [99]) bestimmt.

3.2.2.3. Anreicherung des Enzyms

Als Ausgangsmaterial diente Sojabohnen-Acetonpulver. Die Anreicherung erfolgte in Anlehnung an Lit. 99 : 5 g Rohmaterial wurden mit 50 ml Puffer bei pH 6.8 extrahiert. Zentrifugiert wurde 15 Minuten bei 15 000 rpm im SS-34-Rotor. Gefällt wurde bei 65% Ammoniumsulfatsättigung, der pH wurde mit 10 µl 2 N NaOH je ml Extrakt nachgestellt. Das gefällte Protein wurde in etwa 10% des Extraktvolumens gelöst, dialysiert und zentrifugiert. 2,3 ml des stark opaleszierenden, aber klaren Überstandes wurden in Dialysepuffer an Sephacryl S-300 (2 x 90 cm) bei einer Flußrate von 5 cm/h chromatographiert. Die Aktivität der reinsten Fraktionen wurde wie oben mit Ammoniumsulfat gefällt, in 0,5 ml Puffer aufgenommen, zweimal 1 Stunde dialysiert und zentrifugiert. Der klare, fast farblose Überstand wurde bei 0°C aufbewahrt.

3.2.2.4. Reinheitskriterien

Die Anreicherung der Lipoxigenase wurde über die spezifische Aktivität verfolgt. Nach der Molekularsiebchromatographie wurde eine SDS-Disk-Elektrophorese durchgeführt (s. 3.2.1.4.).

Das für den Verwendungszweck wesentliche Kriterium war die Abwesenheit einer Phospholipase-artigen Fremdaktivität mit Cardiolipin als Substrat.

3.2.3. Lipidextraktion

Mehrere Lösungsmittel wurden auf ihre Eignung für die Extraktion sehr verschiedener Lipide aus wäßriger Phase geprüft.

Aus den Ergebnissen wurde eine Extraktionsprozedur entwickelt, die für die in 3.2.8. behandelten Lipide und deren Reaktionsprodukte geeignet erschien.

3.2.3.1. Extraktion von Hydroperoxilinolsäure

Linolsäure wurde nach 3.2.2.1. mit etwa 0,2 U Lipoxigenase je ml Ansatz quantitativ umgesetzt. 100 µl-Aliquots wurden bei $0^{\circ}C$ teils nach Ansäuern auf pH 1.5 mit 10 µl 1 N Schwefelsäure, teils ohne Ansäuern mit 1,0 ml Chloroform, n-Hexan oder wassergesättigtem n-Butanol intensiv geschüttelt und dann etwa fünf Minuten bei 2 500 rpm zentrifugiert. Die organische Phase wurde quantitativ gesammelt. Jeder Ansatz wurde doppelt durchgeführt. Je ein Ansatz wurde nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff über 15 Stunden lyophilisiert. Alle Ansätze wurden spektrometrisch untersucht. Dazu wurden die Chloroformextrakte mit Reinststickstoff getrocknet und sofort wie die Lyophilisate in je 1,0 ml n-Hexan aufgenommen; die parallel angesetzten Hexan- und Butanolextrakte sowie ein mit B-Puffer verdünntes Aliquot wurden unverändert vermessen. Das Aufnehmen der Spektren ist in 3.2.4. beschrieben. Als Maß für den Grad der Extraktion diente die Absorption bei 234 nm im Vergleich zur nicht extrahierten Probe.

3.2.3.2. Extraktion von Lecithin und Lysolecithin

In Chloroform gelöstes Dilinoleoyllecithin (20 mg/ml) wurde mit Reinststickstoff getrocknet und zu 0,2 mg je ml in B-Puffer aufgenommen (0,25 mM). Ein Teil dieses Ansatzes wurde bei Raumtemperatur wie folgt in das γ-Linoleoyllysolecithin übergeführt: Je ml Ansatz wurden 10 µl Natriumdesoxycholat, 10 µl 5 M Calciumchlorid und 10 µl Schweinepankreas-Phospholipase A_2 (100 µg) zugegeben. Nach der schnellen Klärung wurde zur Sicherstellung vollständiger Hydrolyse noch 20 Minuten abgewartet. Dann wurden 100 µl-Aliquots nach 3.2.3.1. extrahiert. Die wäßrigen Rückstände, die lyophilisierten Extrakte und nicht extrahierte Aliquots wurden auf ihren Phosphatgehalt untersucht (s. 3.2.5.).

3.2.3.3. Extraktion von Linolsäure, Phospho- und Lysophospholipiden sowie den jeweiligen Hydroperoxi- und Hydroxiderivaten

100 bis 114 µl (10% des ursprünglich je ml aufgenommenen Phospholipids) der jeweiligen lipidhaltigen Dispersion wurden bei Dispersion $0^{\circ}C$ zweimal mit je 0,5 ml wassergesättigtem n-Butanol extrahiert. Vor der Lagerung bei -80° wurden Spektren der vereinigten Extrakte aufgenommen (s. 3.2.4.).

Das Lösungsmittel wurde bei Eiskühlung im Hochvakuum am Rotationsverdampfer innerhalb von etwa 30 Minuten abgezogen. Der Rückstand wurde erst in Flüssigstickstoff gekühlt, dann belüftet, sofort mit Reinststickstoff begast und in 20 µl absolutem, stickstoffbegasten Ethanol aufgenommen. Die weitere Lagerung bis zur Durchführung der HPDC (s. 3.2.7.) erfolgte wiederum bei $-80^{\circ}C$.

3.2.4. UV-Spektrometrie

Anhand von UV-Spektren sollte die Reinheit der verwendeten Lipide, die Extraktion von Hydroperoxilinolsäure mit verschiedenen Lösungsmitteln (s. 3.2.3.1.) und die Bildung von Dienprodukten (s. 3.2.8.) untersucht werden.

Die Messungen erfolgten in 1 cm-Halbmikroquarzküvetten (Mindestfüllvolumen 0,95 ml) am UV-300-Spektrometer. Die Geräteparameter waren: Spaltbreite 1 nm, Vorschub 37,5 nm/min, Spreizung 5 nm/cm, response time 0.01 sec. Die Photomultipliersspannung sollte 500 V, die Eigenabsorption der Lösungsmittel 0,5 E nicht überschreiten. Alle Lösungen konnten von 340 bis unter 220 nm gegen das jeweilige Lösungsmittel vermessen werden. Lösungen in n-Butanol wurden bei Raumtemperatur, alle anderen bei etwa $10^{\circ}C$ untersucht. Registriert wurde bei der jeweils größtmöglichen Empfindlichkeit. Vor jeder Messung wurde die Nullinie innerhalb des Meßbereichs mit Lösungsmittel-gefüllten Küvetten bei hoher Empfindlichkeit geprüft.

3.2.5. Phosphatbestimmung

Mit der Phosphatbestimmung sollte die Eignung verschiedener Lösungsmittel für die Extraktion von Lecithin und Lysolecithin aus einer wäßrigen Phase geprüft werden (s. 3.2.3.2.). Sie wurde als Mikrobestimmung (Endvolumen 1,0 ml) nach BARTLETT durchgeführt [101]. Alle Glasgeräte wurden wie unter 3.2.6. beschrieben gereinigt.

Das Reduktionsreagenz, 1-Amino-2-Naphthol-4-sulfonsäure, wurde wie bei FISKE und SUBBAROW beschrieben zweimal umkristallisiert [102]. Lösungen dieses Reagenzes wurden unter Inertgas aufbewahrt.

Eichkurven wurden für den Bereich von 5 bis 30 nMol mit 0,1 mM Kaliumdihydrogenphosphat in 10 N Schwefelsäure angefertigt. Als Leerwerte dienten 0,1 ml entionisiertes Wasser, 0,1 ml B-Puffer und Schwefelsäure ohne Zusätze. Aliquots der wäßrigen Lipidansätze wurden als Maß für vollständige Extraktion verwendet. Eich-, Leer- und Bezugswerte wurden jeweils doppelt bestimmt.

Mit der Probe sollten maximal etwa 25 nMol Phosphat eingesetzt werden. Die Messungen erfolgten bei 830 nm am Zeiss-Photometer.

3.2.6. Bestimmung des Fettsäuremusters von Rinderherz-Cardiolipin

Cardiolipin ist das einzige natürliche Säugetier-Phospholipid mit hohem Linolsäuregehalt. Der Linolsäuregehalt des verwendeten Präparates gibt daher Hinweise auf evtl. vorhandene Verunreinigungen [103]. Ein hoher Linolsäuregehalt des Präparates ist für die Reaktivität mit Lipoxigenase wichtig, da dieses Enzym durch Nicht-Substrat-Fettsäuren gehemmt wird [104].

Die Verseifung von 1 mg Rinderherz-Cardiolipin in Gegenwart von tert.-Butylhydroxitoluol, die Methylierung der freigesetzten Fettsäuren in Gegenwart von Bortrifluorid und die gaschromatographische Analyse der Fettsäuremethylester erfolgten nach den Angaben von FEUERSTEIN [105].

3.2.7. Hochauflösende Dünnschichtchromatographie (HPDC)

Die hochauflösende Dünnschichtchromatographie wurde zur Reinheitsprüfung der verwendeten Phospholipide und zur Verfolgung der in 3.2.8. beschriebenen Reaktionen durchgeführt.

Zur Vermeidung von Störungen ("Geisterbanden") wurden alle eingesetzten Proben unter Beachtung größtmöglicher Sauberkeit nur in Glasgeräten aufgearbeitet. Glasgeräte wurden über Nacht mit warmer Nitriersäure (2 Teile Schwefelsäure auf 1 Teil Salpetersäure) oder mit einer Lösung von 5g Kaliumpermanganat je Liter 2N KOH versetzt, danach in üblicher Weise gespült, mit Wasserdampf behandelt und im Trockenschrank getrocknet.

3.2.7.1. Probenauftrag und Entwicklung der Platten

Innerhalb der 2,5 cm hohen Konzentrierungszone der verwendeten HPDC-Platten wurden die Proben innerhalb eines jeweils 4 mm breiten und etwa 1,8 cm hohen Auftragsbereiches appliziert. Der Abstand zwischen zwei solchen Auftragsbereichen betrug mindestens 5 mm. Die in Hexan, Äthanol oder Chloroform gelösten Substanzen wurden unter Reinststickstoff bei Wasserkühlung (10°C) aufgetragen. Die hierzu verwendeten Oxfordkolbenhubpipetten (1 und 2 µl) erlaubten ein sehr schnelles Nebeneinandersetzen von etwa 0,2 µl - Spots (Chloroform 0,5 µl); der Durchmesser der Spots betrug 2 bis 4 mm .

Nach dem Abdampfen des Lösungsmittels wurde die HPDC-Platte mit der Schichtseite nach unten in die Sandwichkammer eingesetzt. Unmittelbar danach wurde die Entwicklung mit frischem Laufmittel (2 bis 3 ml) gestartet. Die Laufdauer betrug 15 bis 20 Minuten, die Laufstrecke der Lösungsmittelfront in der Trennschicht 5 bis 6 cm.

Die fertig entwickelte Platte wurde je nach der durchzuführenden Anfärbung im Stickstoffstrom oder unter Wärmeeinwirkung getrocknet.

3.2.7.2. Färbemethoden

Lipide wurden in einem mit Joddampf gesättigten Glastrog sichtbar gemacht.

Phospholipide wurden mit Zinzadze-Reagenz nach DITTMER und LESTER angefärbt [106]. Zum Nachweis von Oxidationsmitteln (Hydroperoxiden) wurde die Platte erst mit gesättigter methanolischer Kaliumjodidlösung (frisch angesetzt unter Inertgas) und gleich danach mit 1%iger frischer Stärkelösung besprüht [76].

3.2.7.3. Prüfung der Phospholipide auf freie Fettsäuren

Folgende Lösungen wurden aufgetragen:

a) Linolsäure in Hexan: 1, 2, 5 und 10 µg (3 bis 30 nMol).

b) Dilinoleoyllecithin in Chloroform: 10 µl der vom Hersteller bezogenen Lösung (20 mg/ml, 250 nMol entsprechend 500 nMol Linolsäureester).

c) Cardiolipin in Chloroform: 10 µl der vom Hersteller bezogenen Lösung (20 mg/ml, 140 nMol entsprechend etwa 500 nMol Linolsäureester).

d) Linolsäuremethylester in Hexan: 100 µg (300 nMol).

Entwickelt wurde mit dem für die Auftrennung von Lipiden in Verbindungsklassen verwendeten Laufmittel n-Hexan/Methylethylketon/Eisessig 95 : 4 : 1 (v/v/v) [107]. Die Lipide wurden in der Jodkammer angefärbt.

3.2.7.4. HPDC der mit Lipoxigenase, Glutathionperoxidase und Phospholipase A_2 behandelten Lipide

Die unter 3.2.8. beschriebenen Ansätze wurden nach 3.2.3.3. aufgearbeitet. Je 4 µl der einzelnen Proben wurden in der folgenden Reihenfolge aufgetragen:

1. Linolsäure (L-H)
2. Hydroperoxilinolsäure (L-OOH)
3. Hydroxilinolsäure (L-OH)
4. in B-Puffer dispergiertes Phospholipid (I)

5. Lipoxigenase-behandeltes Phospholipid (II)
6. aufgekochtes Phospholipid (III)
7. Glutathionperoxidase-behandeltes Phospholipid (IV)
8. Phospholipase A_2-behandeltes Phospholipid (V)
9. Lipoxigenase-behandeltes Phospholipid (VI)

Als 10. Probe wurde 1 µl der Original-Phospholipidlösung in Chloroform appliziert, also etwa 50 nMol Linolsäureester. Alle anderen Proben enthielten - quantitative Extraktion vorausgesetzt - je 5 nMol Linolsäure bzw. -ester.

Entwickelt wurde mit einem sauren Standardsystem von SKIPSKI et al.: Chloroform/Methanol/Eisessig/Wasser 50 : 30 : 8 : 4 (v/v/v/v) [108]. Die entwickelten Platten wurden mit je einem der oben genannten drei Reagenzien (s. 3.2.6.2.) angefärbt.

3.2.8. Ansätze zur Prüfung Lipoxigenase-behandelter Lipide auf ihre Substrateigenschaft für Glutathionperoxidase

3.2.8.1. Ansätze mit Linolsäure

Linolsäure wurde nach 3.2.2.1. mit etwa 0,2 U Lipoxigenase je ml quantitativ oxidiert. Zu 900 µl dieses Ansatzes wurden 100 µl des folgenden Cocktails gegeben:

Teil A	4,5 mM NADPH (oder mehr) 1,2 U Glutathionreduktase (nach Herstellerangabe bei 25°C) in B-Puffer
Teil B	etwa 35 mM Glutathion (reduziert) in Wasser.

Jeweils vor Gebrauch wurden 2 Teile A mit 1 Teil B vermischt. Dieser Cocktail ist bei Eiskühlung höchstens 1 Stunde haltbar.

Die Reaktion wurde bei 25°C durch Zugabe von etwa 1,5 U GSH-Px gestartet und am Eppendorf-Photometer mit angeschlossenem Schreiber bei 365 nm verfolgt. Zur Auswertung wurde die nach Reaktionsende konstante, langsame Extinktionsabnahme auf den Zeitpunkt des Reaktionsstarts extrapoliert. Aus der verbleibenden Extinktionsänderung wurde der enzymatische NADPH-Umsatz

ermittelt (ε = 3,5 · mM^{-1} · cm^{-1} [109]).

3.2.8.2. Ansätze mit Phospholipiden ohne Phospholipase-Behandlung

Chloroformlösungen von Dilinoleoyllecithin (PC) und Cardiolipin (CL) wurden mit Reinststickstoff getrocknet und zu etwa 500 µM Linolsäureester in B-Puffer aufgenommen. Nach Überschichten des Lipids mit Puffer wurde erst der Stickstoff durch Raumluft ersetzt und dann das Lipid dispergiert. Die Hydroperoxidierung der Linolsäureester wurde mit etwa 2 U Lipoxigenase je ml Ansatz gestartet und polarographisch verfolgt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 900-µl-Aliquots nach 3.2.8.1. mit Glutathionperoxidase behandelt. Zur Vermeidung von Fehlinterpretationen der Messungen durch Trübungsänderungen wurde vor und nach GSH-Px-Zugabe auch die Extinktion bei 405 nm notiert.

3.2.8.3. Phospholipidansätze mit Phospholipase-Behandlung

PC und CL wurden wie unter 3.2.8.2. mit Lipoxigenase behandelt. Nach 2 Stunden (PC) bzw. 30 Minuten (CL) wurde die Reaktion durch zweiminütige Inkubation bei 100°C abgebrochen. Nach Abkühlung im Eisbad und Temperierung auf 25°C wurden 900-µl-Aliquots wie folgt für die Phospholipasebehandlung vorbereitet:

a) PC: Zugabe von 10 µl 1%iger Natriumdesoxycholatlösung (molares Verhältnis PC : Na-DOC etwa 1 : 1 [110]), 2 µl 0,3 M EDTA pH 8.0 und 2 µl 5 M Calciumchlorid in dieser Reihenfolge.

b) CL: Zugabe nur von je 2 µl EDTA und Calciumchlorid (vgl. Lit. [111]).

Sobald die Extinktion bei 405 nm konstant war, wurden 100 µl Cocktail mit mindestens 6 mM NADPH zugegeben (3.2.8.2.). Nach erneuter Registrierung beider Extinktionen wurden etwa 1,5 U GSH-Px zugegeben und die Extinktionen bei 365 nm kontinuierlich, bei 405 nm gelegentlich registriert. Nach Reaktionsende wurden 10 µl (100 µg, 60 U nach Herstellerangabe) Schweine-

pankreas-Phospholipase A_2 zugesetzt und wieder beide Extinktionen verfolgt. Das Reaktionsende wurde nach etwa 20 Minuten angenommen, nachdem der Extinktionsabfall bei 365 nm über 5 Minuten niedrig und konstant blieb und bei 405 nm keine Extinktionsänderung mehr erfolgte. Zu diesem Zeitpunkt wurden nochmals etwa 2 U Lipoxigenase zugesetzt; Sauerstoffverarmung wurde druch heftiges Rühren bei Reaktionsende ausgeschlossen. Durch Zugabe von etwa 120 nMol t-BHP wurde schließlich noch die Funktion des GSH-Px/GR/NADPH-Systems nachgewiesen.

Während der Phospholipase-Behandlung klart der PC-Ansatz merklich auf. Da trübungsbedingte Extinktionsänderungen wellenlängenabhängig sind, wurde der Effekt bei 405 nm in mehreren Vorversuchen mit dem bei 365 nm verglichen.

In weiteren Vorversuchen wurde geprüft, ob die Reihenfolge der Zugaben von GSH-Px und Phospholipase einen Einfluß auf den NADPH-Verbrauch hat.

4. ERGEBNISSE

4.1. Isolierung der Glutathionperoxidase

4.1.1. Enzymreinigung

Zahlreiche Reinigungen der Glutathionperoxidase führten zu den folgenden Befunden:

1. Nach Vorschrift isoliertes Enzym ist weitestgehend rein (vgl. 4.1.2.).
2. Alle Reinigungsschritte außer der Lösungmittelfällung und der Ionenaustauschchromatographie verlaufen in der Regel verlustfrei; die effektive Ausbeute beträgt bei allen Schritten außer der Ionenaustauschchromatographie mindestens 85%.
3. Aus immer noch ungeklärter Ursache kann die Aktivität des Enzyms während oder nach der Präparation in kürzester Zeit auf den halben Wert abfallen.
4. Stabil ist das Enzym in kristallisierter und in lyophilisierter Form. Während des Lyophilisierens treten allerdings gelegentlich hohe Aktivitätsverluste auf.
5. Die Reinigung läßt sich nach guter Vorbereitung in ein bis zwei Wochen durchführen.

Ein dem inzwischen erreichten Erfahrungsstand entsprechendes Reinigungsschema ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Enzym hatte eine spezifische Aktivität von über 750 U/mg.

4.1.2. Reinheitskriterien

Die spezifische Aktivität des gereinigten Enyzms lag meist bei 500 bis 600 U/mg. Als Extremwerte wurden 300 und 800 U/mg beobachtet.

Die Durchführung der SDS-Disk-Elektrophoresen im neuen LKB-Gerät brachte folgende Erkenntnisse:

1. Das nach Vorschrift gereinigte Enzym ist nicht absolut rein.

Stufe	Volumen [l]	Protein [g]	Protein-konzentration [g/l]	Gesamt-aktivität [kU]*	Volumen-aktivität [kU/l]	spezifische Aktivität [kU/g]	bezogen auf Hämolysat:		bezogen auf letzten Schritt		GSH-Px [mg]**
							Anreicherung	% Ausbeute	Anreicherung	% Ausbeute	
Rinderblut	12	1440	120 [1]	144	12	0,1	-	-	-	-	240
Hämolysat	13,5	1350	100 [1]	135	10	0,1	1,0	100	1,0	100	225
Lösungsmittelfällung	19	33	5,4 [2]	115	6	3,5	35	85	35	85	190
gewaschenes Konzentrat	0,34	6,7	20 [2]	101	300	15	150	75	4,3	88	170
Phosphatfällung	0,1	0,53	5,3 [2]	95	950	180	1800	70	12	94	160
Phenylsepharose	0,2	0,3	1,5 [3]	88	440	300	3000	65	1,7	93	145
DEAE-Sephadex	0,3	0,2	0,6 [3]	75	250	400	4000	55	1,3	85	125
Ultrafiltration	0,018	0,2	10 [3]	75	4150	400	4000	55	1,0	100	125
Sephacryl S-300	0,150	0,1	0,7 [3]	67	450	600	6000	50	1,5	89	110

* 1 kU = 1000 U

** bezogen auf eine spezifische Aktivität des Reinstenzyms von 600 kU/g

Proteinbestimmung: [1] nach Drabkin [93], [2] nach Kalkar [95], [3] nach Flohé et. al. [24]

Tabelle 1: Isolierung von Glutathionperoxidase (GSH-Px) aus Rindererythrozyten.

Es werden Fremdproteinbanden bei etwa 60 000 D und etwa 30 000 D beobachtet. Die schwerere macht, nach ihrer Intensität, weniger als 1%, die leichtere maximal 5% des Gesamtproteins aus.

2. Die früher beobachtete relativ breite Proteinbande der GSH-Px etwas oberhalb von 20 000 D wird zu mehreren scharfen Banden zwischen etwa 20 000 und 25 000 D aufgelöst. Bei älteren Präparaten scheinen die leichteren Banden zu überwiegen; außerdem werden hier zunehmend Banden von etwa 18 000 D und kleiner beobachtet.

Aus UV-Spektren der Enzympräparate läßt sich ableiten, daß

1. das reine Enzym weniger als 0,02% Katalase enthält,
2. erst weitestgehend gereinigtes Enzym ein Extinktionsverhältnis $E_{Max}(280)/E_{Min}(250)$ von über 2 aufweist.

4.2. Anreicherung der Lipoxigenase

4.2.1. Aktivitätsbestimmung

Die polarographische Aktivitätsbestimmung lieferte etwa 10% höhere Werte als die photometrische. Es muß beachtet werden, daß Linolsäure durch Peroxidation vollständig wasserlöslich wird.

Zu Problemen beim Aktivitätstest vgl. Lit. [99]. Auf eine Unterscheidung der Isoenzyme [99] wurde in der Regel verzichtet.

Der Sauerstoffverbrauch durch die Elektrode beträgt in Wasser oder B-Puffer 8% je Stunde.

Die Aktivität mit Phospholipiden beträgt nur etwa 0,3% der mit Linolsäure bestimmten.

4.2.2. Anreicherung des Enzyms

Es wurde ein genügend konzentriertes Enzympräparat erhalten, das Linolsäure, Dilinoleoyllecithin und Rinderherz-Cardiolipin (Linolsäureestergehalt über 90%, s. 4.6.) oxidiert. Der Verlauf der Reinigung ist in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Stufe	Volumen [ml]	Protein [mg]	Protein-konzentration [mg/ml]	Gesamt-aktivität [U]	Volumen-aktivität [U/l] +	spezifische Aktivität [U/mg]	Anreicherung	% Ausbeute
Rohextrakt	40	1600	40 1)	1000	40	0,6	1,0	100
Ammoniumsulfatfällung	6,9	415	60 1)	690	100	1,7	2,7	69
Sephacryl S-300 *	18	12	0,7 2)	160	9	13	21	16
Konzentrat	0,7	11	15,5 2)	140	200	13	21	14

* nur 1/3 des Gesamtproteins wurde weiterverarbeitet
Proteinbestimmung: 1) nach Lowry et. al. [100], 2) nach $\epsilon^{1\%}_{280nm} = 14,0$ [99]
+ vgl. Text

Tabelle 2: Anreicherung von Lipoxigenase aus Sojabohnen.

Die Aktivitätsbestimmungen haben nur Näherungscharakter [99].

Die Aktivität des Präparates vor allem mit Phospholipiden nahm unabhängig von der Reinheit in der ersten Woche merklich, nach zwei Wochen stark ab.

4.2.3. Reinheitskriterien

Die SDS-Elektrophorese des Enzymkonzentrates zeigte neben der 100 000 D-Bande der Lipoxigenase [99] drei ähnlich intensive und viele sehr schwache Banden.

Eine störende Fremdaktivität (s. 4.7.2.) wurde am Molekularsieb abgetrennt. Die Reaktivität mit Lecithin wurde durch diesen Schritt nicht beeinflußt.

4.3. Lipidextraktion

4.3.1. Extraktion von Hydroperoxilinolsäure

Aus dem Spektrum der nicht extrahierten Hydroperoxilinolsäure in B-Puffer (Abb. 2) errechnet sich ein Produktgehalt von 200 nMol, aus dem Sauerstoffverbrauch einer von 220 nMol. Eingesetzt wurden etwa 230 nMol Linolsäure.

Die Ergebnisse der Extraktion sind in Tabelle 3 (Lyophilisate) und Tabelle 4 zusammengefaßt. Angegeben sind die prozentual im Extrakt gefundenen Mengen.

Der direkt gemessene, neutrale Hexanextrakt zeigte ein Absorptionsmaximum bei 228 nm. Die übrigen Extrakte wiesen an dieser Stelle eine erkennbare Schulter auf. Der lyophilisierte, saure Butanolextrakt absorbierte sehr stark bei 280 nm.

4.3.2. Extraktion von Lecithin und Lysolecithin

Mit der Phosphatbestimmung wurden im Lecithinansatz 275 nMol, im Lysolecithinansatz 220 nMol Phosphat je ml gefunden. Unter Bezug auf die Konzentrationsangabe des Herstellers waren etwa 250 nMol eingesetzt worden.

Die in den einzelnen Extrakten und den zugehörigen Rückständen

	Chloroform	n-Hexan	n-Butanol
+ H_2SO_4	3%	22%	13%
- H_2SO_4	25%	13%	57%

Tabelle 3: Hydroperoxilinolsäure in lyophilisierten Extrakten.

	Chloroform	n-Hexan	n-Butanol
+ H_2SO_4	57%	42%	100%
- H_2SO_4	49%	15%	100%

Tabelle 4: Hydroperoxilinolsäure in direkt gemessenen Extrakten.

	Chloroform		n-Hexan		n-Butanol	
	E	R	E	R	E	R
+ H_2SO_4	67%	17%	59%	26%	96%	3%
- H_2SO_4	30%	60%	5%	92%	93%	12%

Tabelle 5: Verteilung des Lecithinphosphors auf Extraktionsmittel (E) und wäßrigen Rückstand (R).

	Chloroform		n-Hexan		n-Butanol	
	E	R	E	R	E	R
+ H_2SO_4	35%	56%	0%	91%	92%	11%
- H_2SO_4	0%	86%	0%	97%	90%	22%

Tabelle 6: Verteilung des γ-Lysolecithinphosphors auf Extraktionsmittel (E) und wäßrigen Rückstand (R).

gefundenen prozentualen Anteile am Gesamtphosphat sind in Tabelle 5 (Lecithin) und Tabelle 6 (Lysolecithin) einander gegenübergestellt.

4.4. Phosphatbestimmung

Die von BARTLETT angegebene Eichgerade [101] ließ sich exakt reproduzieren. Das verwendete Wasser und der B-Puffer enthielten weniger als 2 µM Phosphat.

4.5. Prüfung der Phospholipide auf freie Fettsäuren

In den geprüften Phospholipiden ließen sich nur Spuren einer Substanz mit dem R_f-Wert der Linolsäure nachweisen. Andere Nicht-Phospholipid-Lipidspezies wurden nicht gefunden.

4.6. Fettsäuremuster von Rinderherz-Cardiolipin

Nur die drei folgenden Fettsäuren waren nachweisbar:

Palmitinsäure	4,1 Mol%
Ölsäure	3,3 Mol%
Linolsäure	92,6 Mol%

Der Linolsäuregehalt liegt über dem Literaturwert von 91% [103].

4.7. Ansätze zur Prüfung Lipoxigenase-behandelter Lipide auf ihre Substrateigenschaft für Glutathionperoxidase

4.7.1. Ansätze mit Linolsäure

Die Ergebnisse der Hydroperoxidierung sind in 4.3.1. beschrieben.

Bezogen auf den gesamten Linolsäureansatz (1 ml) wurden bei der Reduktion der Hydroperoxilinolsäure mit GSH-Px im NADPH-gekoppelten System 210 nMol NADPH umgesetzt. Nicht mit Lipoxigenase behandelte Linolsäure verursacht unter den Testbedingungen keinen NADPH-Umsatz.

In Abbildung 2 sind Spektren von Linolsäure (0,25 mM in n-Hexan) und Hydroperoxilinolsäure (0,02 mM in B-Puffer) abgebildet. Hydroperoxi- und Hydroxilinolsäure zeigten innerhalb des Meßbe-

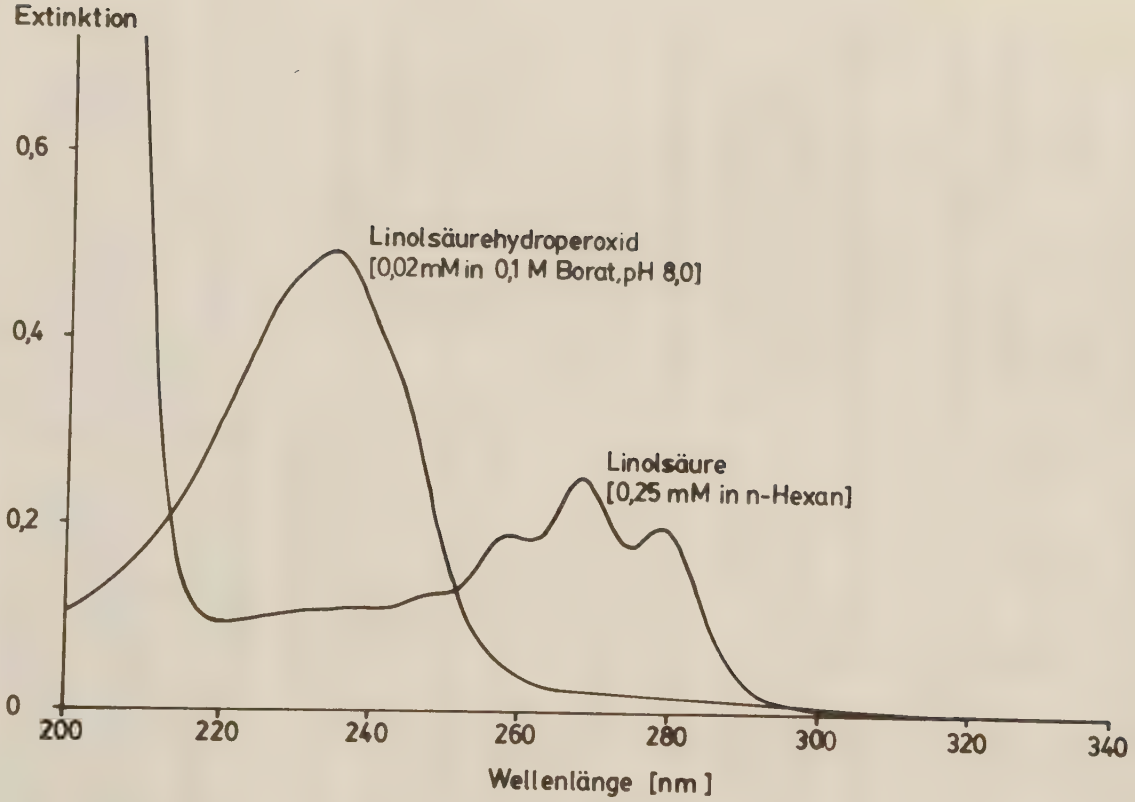


Abbildung 2: UV-Absorptionsspektren von Linolsäure und Hydroperoxilinolsäure.

reiches praktisch identische Spektren. Die zwischen 285 und 245 nm zu beobachtenden 4 Absorptionsbanden des Linolsäurepräparates waren nach GSH-Px-Behandlung unverändert. Nach Lipoxigenase-Behandlung waren sie nicht mehr zu erkennen.

4.7.2. Ansätze mit Phospholipiden ohne Phospholipase-Behandlung

Nicht mit Lipoxigenase behandelte Phospholipide zeigten je etwa 450 nMol Linolsäureester im gekoppelten System mit GSH-Px folgende NADPH-Umsätze:

Lecithin : 23 nMol (5%)
Cardiolipin: etwa 4 nMol (etwa 1%)

Die gleichen Umsätze wurden zu beliebigen Zeitpunkten nach Zugabe von Molekularsieb-gereinigter Lipoxigenase beobachtet. Die Inkubation von Cardiolipin mit lediglich durch Ammoniumsulfatfällung (s. Tabelle 2) angereicherte Lipoxigenase führte zu einer zeitabhängigen Zunahme des NADPH-Umsatzes. Der auf den jeweiligen Sauerstoffverbrauch bezogene relative NADPH-Umsatz war jedoch weitgehend zeitunabhängig und betrug 25 bis 35%.

Der NADPH-Umsatz mit Lecithin war von der Reinheit der Lipoxigenase unabhängig. Auch durch Zugabe der zehnfachen GSH-Px-Menge ließ er sich nicht steigern.

4.7.3. Phospholipidansätze mit Phospholipasebehandlung

4.7.3.1. Ansätze mit Dilinoleoyllecithin

Der Versuchsablauf ist in Abbildung 3 dargestellt. Sie zeigt den Sauerstoffverbrauch während der Lecithinperoxidierung und die durch NADPH-Verbrauch (365 nm) und Trübungseffekte (405 und 365 nm) verursachten Extinktionsänderungen. Zusätzlich wurde die Dien-Konzentration (E_{234}) zu verschiedenen Zeitpunkten eingetragen und die Reaktivität mit Kaliumjodid-Stärke nach HPDC vermerkt.

Das während der Phospholipase-Behandlung zu beobachtende Aufklaren des Ansatzes verursachte bei 365 nm eine 1,15 bis

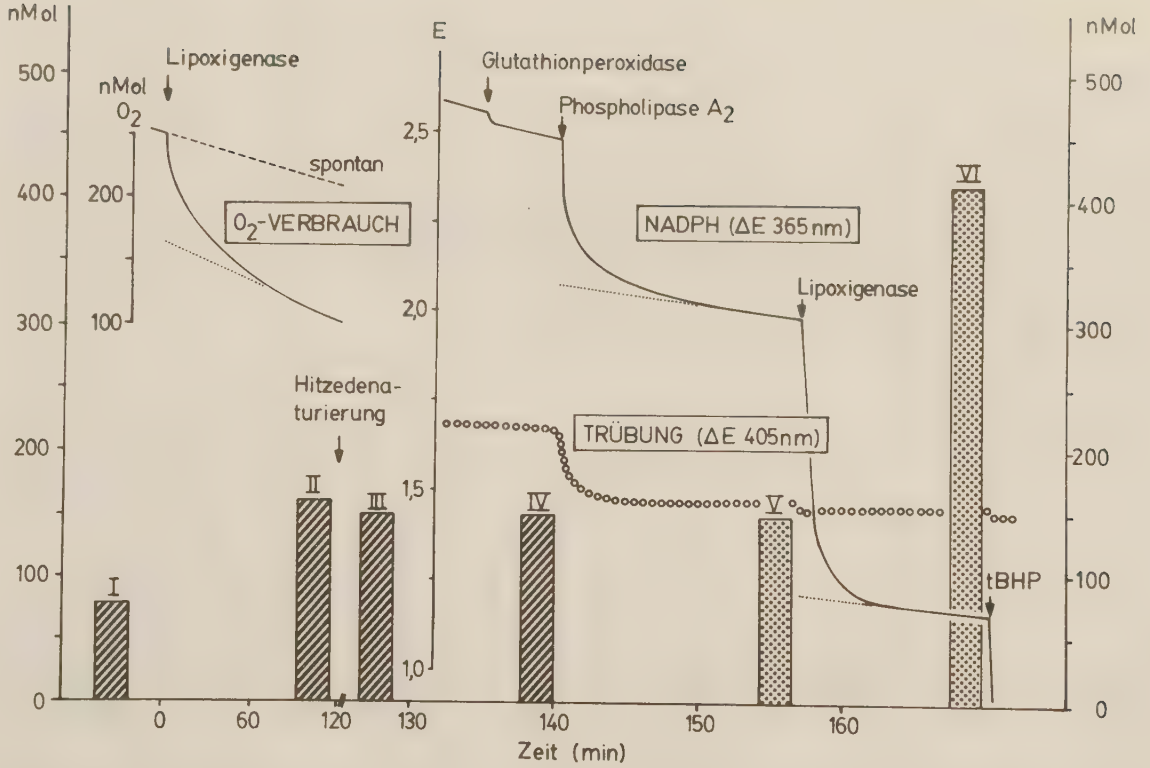


Abbildung 3: Lipoxigenase-, Phospholipase- und Gluthationperoxidase-Behandlung von Dilinoleoyllecithin (PC).

Legende zu Abbildung 3:

Die Säulen geben den Diengehalt (Hydroperoxi- und Hydroxilinolsäureester) des Lecithins zu verschiedenen Zeitpunkten in nMol an ($\varepsilon_{234} = 25 \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-1}$ [99]).

Schraffierte Säulen bedeuten positive, gepunktete negative Reaktion mit Kaliumjodid-Stärke nach HPDC.

Der spontane O_2-Verbrauch ist verursacht durch den Eigenverbrauch der Elektrode (19 nMol je Stunde).

Die Spreizung der Extinktionsskala bezieht sich auf die NADPH-Absorption ($\varepsilon_{365} = 3{,}5 \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-1}$ [109]).

Das Aufklaren der PC-Dispersion durch Phospholipase-Behandlung wurde bei 405 nm registriert. Die durch Trübung bedingte Extinktionsänderung ist bei 365 nm 1,15 bis 1,35mal so groß wie bei 405 nm.

Die angegebenen Stufen haben folgende Bedeutung:

STUFE	ANSATZ	MENGE	VORGANG	UMSATZ n Mol TOTAL	nMol/min START	nMol/min ENDE
I	PC	500–550 nMol	Dispersion in 1 ml 0,1 M K-Boratpuffer, pH 8.0	–	–	–
II	+ Lipoxigenase	2 U	Hydroperoxidierung der veresterten Linolsäure	110 (O_2)	5	0,2[+)]
III	Hitzedenaturierung	2 min., 100°C	Inaktivierung der Lipoxigenase	–	–	–
IV	+ GSH-Px	1,5 U	Versuch der NADPH-gekoppelten Reduktion der veresterten Hydroperoxilinolsäure	2 (NADPH)	n.b.	≤ 2,6
V	+ Pankreas-Phospholipase A_2	0,1 mg	Freisetzung der an mittlerer Position im PC veresterten Fettsäure; gleichzeitig Reduktion der freigesetzten Hydroperoxilinolsäure	38–52[++)] (NADPH)	≤ 310	1,6
VI	+ Lipoxigenase	2 U	Hydroperoxidierung und anschließende Reduktion der freigesetzten Linolsäure	216 (NADPH)	180	1,4
–	+ tBHP	120 nMol	Kontrolle der mit der GSH-Px-Reaktion gekoppelten NADPH-Oxidation	–	430 (NADPH)	–

[+)] korrigiert um den Eigenverbrauch der O_2-Elektrode (s.o.)

[++)] korrigiert um den Trübungsfaktor (s.o.)

n.b. = nicht bestimmbar

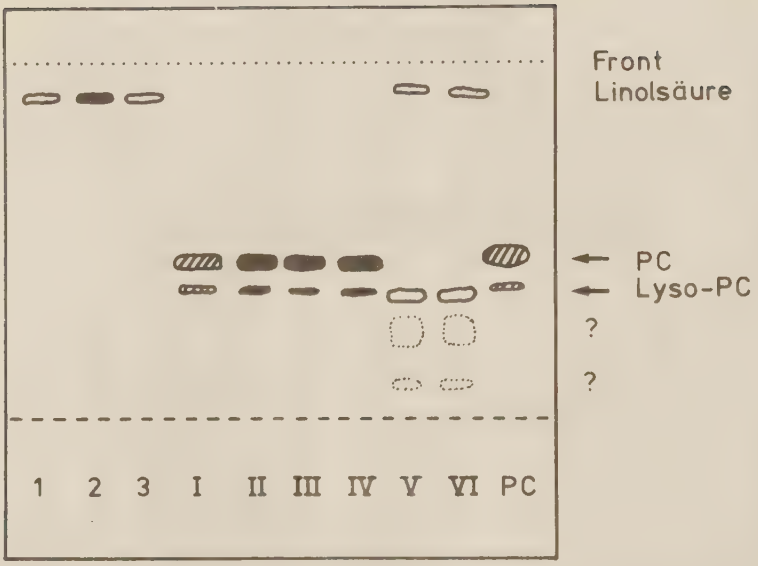


Abbildung 4: HPDC von Lipoxigenase-, Glutathionperoxidase- und Phospholipase-behandeltem Dilinoleoyllecithin (PC).

Mit Jod anfärbbare Flecke sind eingekreist, schwache Färbung ist mit gepunkteter Linie markiert. Die Pfeile weisen auf die Flecke mit positivem Phospholipidnachweis. Der Kaliumjodid-Stärke-Nachweis auf Hydroperoxide ist durch Schraffur (schwache Reaktion) oder Auszeichnung der Flecke (starke Reaktion) angedeutet.

1 = Linolsäure, 2 = Hydroperoxilinolsäure, 3 = Hydroxilinolsäure.

Zur Bedeutung der Proben I - VI s. untenstehende Tabelle.

Stufe	O_2 Verbrauch [nMol]	NADPH Abnahme [nMol]	Dien-Gehalt [nMol]	HPDC:KJ-Stärke-Reaktion
I PC in B-Puffer	-	-	77	+
II Lipoxigenase I	110	-	160	++
III Aufkochen	-	-	150	++
IV GSH-Px	-	2	150	++
V Phospholipase A_2	-	38-52	147	-
VI Lipoxigenase II	-	216	413	-

Tabelle 7: Ergebnisse der Lipoxigenase-, Glutathionperoxidase- und Phospholipase-Behandlung von Dilinoleoyllecithin.

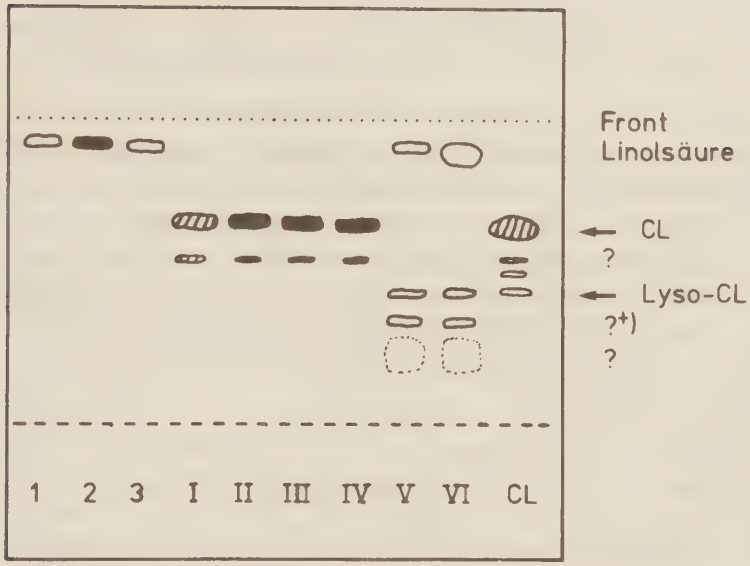


Abbildung 5: HPDC von Lipoxigenase-, Glutathionperoxidase- und Phospholipase-behandeltem Rinderherz-Cardiolipin.

+) Phospholipidnachweis unsicher.

CL = Rinderherz-Cardiolipin.

Weitere Erklärungen s. nebenstehende Abbildung 4.

Stufe	O_2 Verbrauch [nMol]	NADPH Abnahme [nMol]	Dien-Gehalt [nMol]	HPDC:KJ-Stärke-Reaktion
I CL in B-Puffer	-	-	25	+
II Lipoxigenase I	240	-	≤100	++
III Aufkochen	-	-	86	++
IV GSH-Px	-	~0	88	++
V Phospholipase A_2	-	ca. 55	91	-
VI Lipoxigenase II	-	ca. 175	432	-

Tabbelle 8: Ergebnisse der Lipoxigenase-, Glutathionperoxidase- und Phospholipase-Behandlung von Cardiolipin.

1,35 fach stärkere Extinktionsabnahme als bei 405 nm. Die Reihenfolge der Zugaben von GSH-Px und Phospholipase hatte auf die NADPH-spezifische Extinktionsänderung keinen Einfluß.

Die für Sauerstoffverbrauch, NADPH-Abnahme und Dienbildung (E_{234}) bestimmten Umsätze sind in Tabelle 7 zusammengefaßt. Von den Sauerstoff- und NADPH-Werten wurden die Spontanumsätze abgezogen. Alle Werte sind in nMol angegeben und beziehen sich auf Lipid in 1 ml B-Puffer; das sind nach der Konzentrationsangabe des Herstellers 500 nMol, nach der Phosphatbestimmung 550 nMol Linolsäureester. Zusätzlich wurden die Ergebnisse der Kaliumjodid-Stärke-Färbung nach HPDC qualitativ angegeben.

Die Ergebnisse der HPDC sind in Abbildung 4 dargestellt: Mit Jod anfärbbare Banden sind eingekreist, als Phospholipid identifizierte Banden mit einem Pfeil markiert; die Intensität der KJ-Stärke-Reaktion ist durch Schraffur angedeutet.

Die in den Spektren der Extrakte beobachtete Absorption bei 280 nm war nach allen Schritten gleich niedrig. Sie entspricht - bezogen auf die insgesamt eingesetzte Linolsäure - einem Ketodiengehalt von etwa 4% ($\varepsilon_{277} = 22 \cdot mM^{-1} \cdot cm^{-1}$ [112]).

4.7.3.2. Ansätze mit Cardiolipin

Die Ergebnisse des NADPH-Umsatzes haben nur Näherungscharakter, da die Extinktion des Ansatzes sehr stark von Trübungsänderungen beeinflußt wurde. Diese ließen sich trotz der Referenzmessung bei 405 nm nur schlecht korrigieren.

Das Spektrum des Extraktes nach der ersten Lipoxigenasebehandlung konnte wegen Störabsorptionen bei 228 und 224 nm nicht exakt ausgewertet werden.

Die verschiedenen Umsätze sind, wie in 4.6.3.1. für Lecithin beschrieben, in Tabelle 8 zusammengefaßt. Eingesetzt wurden nach der Konzentrationsangabe des Herstellers etwa 140 nMol Cardiolipin je ml oder etwa 500 nMol Linolsäureester (s. 4.6.).

Der Sauerstoffverbrauch stieg während der ersten Lipoxigenasebehandlung von etwa 7 auf 13 nMol je Minute an.

Die Ergebnisse der HPDC sind, wie in 4.7.3.1. für Lecithin beschrieben, in Abbildung 5 dargestellt.

Die insgesamt geringe Absorption bei 280 nm in den Spektren der Extrakte nahm während des Versuches zu. Berechnet als Ketodien (vgl. 4.7.3.1.) ergibt sich eine Zunahme des Gehaltes von unter 1% auf etwa 4% der insgesamt eingesetzten Linolsäure.

5. DISKUSSION

5.1. Isolierung der Glutathionperoxidase

5.1.1. Enzymreinigung

Zu einzelnen Schritten der Enzymreinigung ist noch Folgendes anzumerken:

Lösungsmittelfällung:
Mit diesem Schritt [113] werden stets mehr als 99,9% des Hämoglobins abgetrennt. Insgesamt dürfen die Fällungsbedingungen noch nicht als optimiert gelten, da in einzelnen Ansätzen schon wesentlich höhere Ausbeuten als 85% erzielt wurden. Der erst vor kurzem eingeführte Mannitzusatz bewirkt anscheinend etwas geringere Hämoglobinfällung bei trotzdem höherer Anreicherung. Das ungefällte Hämoglobin stört bei der weiteren Reinigung nur in Gegenwart von Mannit nicht (s. Phosphatfällung).

Gründliches Waschen des konzentrierten Fällungsüberstandes im Hohlfaserkonzentrator (Ausschlußgrenze 50 000 D) ist mit einer mehrfachen Anreicherung verbunden und ermöglicht ein weiteres Einengen des Konzentrates.

Phosphatfällung:
Die für die GSH-Px-Fällung benötigte Phosphatkonzentration scheint linear von der Proteinkonzentration abzuhängen: Bei verdünnten Lösungen wird vollständige Fällung erst bei 2,5 M Phosphat erreicht, während bei einer Proteinkonzentration von 27 mg/ml hierfür 1,4 M Phosphat genügten. Bei hoher Proteinkonzentration ist die Anreicherung wesentlich besser als bei niederer (vgl. Tabelle 1, S. 28, mit Tabelle 1 in Lit. 94). Außerdem wird mit steigender Phosphatkonzentration das Sedimentieren des ausgefallenen Proteins wegen der Dichtezunahme des Mediums erschwert. Proteinkonzentrationen über 25 mg/ml sollten vermieden werden [25], optimal sind vielleicht 20 mg/ml (etwa 1,6 M Phosphat). In Gegenwart von Mannit wird die Fällung von verbliebenem Hämoglobin verhindert. Ausgefallenes Hämoglobin störte früher bei der Extraktion des gefällten Enzyms erheblich.

Zu beachten ist die Thermolabilität der GSH-Px bei höheren Phosphatkonzentrationen. Schnelle Auf- und Weiterverarbeitung nach Möglichkeit bei Eiskühlung ist wichtig.

Phenylsepharose:
Wird hier bereits gut angereichertes Enzym (150-200 U/mg) eingesetzt, läßt es sich ohne wesentlichen Einfluß auf die Reinheit bei jeder Ionenstärke unter 0,5 M Phosphat eluieren. Gründliches Waschen des beladenen Gels mit 0,5 M Phosphat (etwa 10 Säulenvolumina) ist allerdings wichtig. Die Elution mit phosphatfreiem Mannitwasser liefert ein konzentriertes, salzarmes Eluat, das ohne Konzentrierung für die nachfolgende Ionenaustauschchromatographie eingesetzt werden kann. Mannit vermindert vielleicht die Gefahr von Enzymverlusten durch niedere Ionenstärke [25]; auf die Chromatographie hatte es bei der verwendeten Konzentration keinen erkennbaren Einfluß. Die wichtigsten Grundsätze für diesen Schritt sind: minimale Gelmenge, schnelle Durchführung und pH 8 in allen Puffern [25].

DEAE-Sephadex:
Dieser an sich sehr effektive Schritt ist meistens mit größeren Enzymverlusten verbunden. Die SDS-Disk-Elektrophorese zeigt, daß bereits bei der beschriebenen "Durchlaufchromatographie" die meisten Fremdproteinbanden eliminiert werden. Hierbei gebundenes Enzym ist kaum wieder eluierbar. Die Reinigungswirkung der nach Lit. 94 durchgeführten Chromatographie ist trotz der Verluste größer.

Kristallisation:
Nach der Phosphatfällung mehrmals kristallisiertes Enzym ließ sich mit Chromatographien an Phenylsepharose, DEAE-Sephadex (im Durchlauf) und Sephacryl S-300 nicht weiter reinigen. Es zeigte in der Elektrophorese eine dem nach Lit. 94 gereinigten Enzym sehr ähnliche Reinheit. Das Kristallisieren ist vielleicht eine Alternative für den Ionenaustauscher.

5.1.2. Reinheitskriterien

Die spezifische Aktivität ist als relatives Maß das wichtigste Kriterium zur Beurteilung des Ablaufes einer Präparation. Da reine Enzympräparate z.T. sehr unterschiedliche spezifische Aktivität zeigen, läßt sie keine absolute Reinheitsaussage zu.

Die sehr zeitaufwendige SDS-Disk-Elektrophorese hat eine hohe Aussagekraft über den Verlauf der Präparation. Als echtes Reinheitskriterium kann sie nur in Verbindung mit anderen Elektrophoreseverfahren dienen.

Das Absorptionsverhältnis von UV-Maximum (etwa 280 nm) zu UV-Minimum (etwa 250 nm) ermöglicht während der Endreinigung als relatives Maß das schnelle Auffinden der saubersten Fraktionen. Die Wahl des richtigen Referenzpuffers ist für diese Messung von großer Bedeutung, da EDTA und Azid bei 250 nm stark absorbieren.

5.1.3. Enzymalterung

Die anscheinend altersabhängige Änderung des Bandenmusters in der SDS-Elektrophorese verleitet zu dem Schluß, daß das Enzym anfangs an den Peptidkettenenden kleinere Peptide aus vielleicht 10 bis 20 Aminosäuren verliert und später auch im Inneren der Peptidkette gespalten wird. Ursache dieser Kettenbrüche und ihre Konsequenzen für die Eigenschaften der GSH-Px sind unbekannt.

5.2. Anreicherung der Lipoxigenase

5.2.1. Anreicherung des Enzyms

Bereits nach der ersten Ammoniumsulfatfällung (s. Tabelle 2, S. 30) wurde ein genügend konzentriertes Enzympräparat erhalten, das Dilinoleoyllecithin ohne erkennbare Nebenreaktionen hydroperoxidierte. Im Cardiolipinansatz wurde dagegen eine - übrigens mit Calciumionen aktivierbare - Fremdaktivität erkennbar, die zu einem GSH-Px-abhängigen NADPH-Verbrauch ohne Phospholipasezusatz führte. Hierbei handelte es sich vielleicht um eine Phospholipase A mit ausgeprägter Spezifität für anionische Phos-

pholipide (vgl. Lit. 68). Eine weitere Fremdaktivität mit gealtertem Cardiolipin verbrauchte Sauerstoff, ohne Dien zu bilden (vgl. Tabelle 8, S. 39). Eine Beeinträchtigung des Versuchsablaufes durch diese nicht weiter charakterisierte Fremdaktivität war nicht zu erkennen.

Auf eine Trennung der Isoenzyme [99] wurde verzichtet. Vorversuche zeigten, daß dies zu hohen Aktivitätsverlusten bei geringer Anreicherung führt. Bessere Versuchsergebnisse waren mit hochgereinigten Isoenzymen nicht zu erwarten.

5.2.2. Aktivitätsbestimmung

Die reproduzierbare Bestimmung der Lipoxigenaseaktivität ist von der sehr genauen Einhaltung der Testbedingungen und von der Isoenzymspezies abhängig [99]. Da ein Isoenzymgemisch verwendet wurde, wurde die Aktivität unter den späteren Reaktionsbedingungen gemessen. Beim pH dieser Ansätze (pH 8.0) zeigen Lipoxigenase mit verschiedenen Linolsäureestern [114], GSH-Px mit Hydroperoxilinolsäure [115] und die verwendete Phospholipase [111] optimale Aktivität; Glutathionreduktase hat noch 70% der Maximalaktivität [116].

5.3. Lipidextraktion

Aus den Ergebnissen der Lipidextraktion (s. Tabellen 3-6, S. 32) geht eindeutig hervor, daß für die vorgesehenen Ansätze Chloroform und Hexan insgesamt ungeeignet sind. Die ungenügende Extraktion des stark polaren Lysolecithins mit Hexan überrascht nicht. Die Unbrauchbarkeit von Chloroform für die Extraktion von Lysolecithin ist dagegen schon lange erkannt [118], wird aber nur von wenigen Autoren berücksichtigt. Wenn z.B. McCAY, wie schon in der Einleitung bemerkt (s. 1.3.3.), nach Chloroformextraktion im Lipid auch die gesättigten Fettsäuren nicht vollständig wiederfindet [74], dann ist die Bildung von Lysophospholipiden durch endogene Phospholipasen [64] eine mögliche Ursache.

Gerade Chloroform birgt wegen seiner Unbeständigkeit gegen Licht und Luft zahlreiche Gefahren für extrahierte Lipide [119].

So bewirkt z.B. die beim Spontanzerfall freigesetzte Salzsäure vor allem in Gegenwart von Alkoholen die Spaltung von Lipidestern: Die Umesterung ist im Vergleich zur Esterhydrolyse eine außerordentlich schnelle Reaktion [120]. Säure begünstigt die Extraktion von freien Fettsäuren [121] und ermöglicht erst die Hexanextraktion von Hydr(oper)oxilinolsäure [117]. Andererseits katalysiert sie die Elimination von H_2O z.B. aus Hydr(oper)oxilinolsäure (vgl. Lit. 112, 115), da hierbei dreifach konjugierte Systeme (Triene bzw. Ketodiene) entstehen. Im Hochvakuum laufen offensichtlich weitere Nebenreaktionen ab, wie die geringen Ausbeuten in Tabelle 3 zeigen. Zusammen mit diesen Punkten war bei der Aufarbeitung auch die hohe Oxidationsanfälligkeit getrockneter Lipide selbst bei -20°C [122] zu beachten.

In Übereinstimmung mit der Literatur [118] löst sich Lysolecithin auch im besten der drei Extraktionsmittel schlechter als in Wasser: 80%ige Extraktion bei 10 Teilen Butanol auf 1 Teil Puffer entspricht einem Verteilungskoeffizienten von 0,4. Auch nach der unter 3.2.3.3. beschriebenen Prozedur ist eine vollständige Extraktion nicht zu erwarten (etwa 90% Lysolecithin).

5.4. Hochauflösende Dünnschichtchromatographie (HPDC)

Die für die Entwicklung der HPDC-Platten verwendete Sandwichkammer [123] verhindert das Abdampfen des Laufmittels von der Platte. Dies macht die Entwicklung weitgehend unabhängig von äußeren Störungen, verringert die Entwicklungszeit (s.u.) und ermöglicht eine hohe Reproduzierbarkeit der Trennung.

Die verwendeten Kieselplatten stabilisieren zwar hochungesättigte Fettsäuren gegen Autoxidation [124], katalysieren aber andererseits wegen ihres sauren Charakters die Dehydratisierung von Hydroperoxilinolsäure [115] und wohl auch Hydroxilinolsäure (vgl. 5.3.). Hydroperoxilinolsäure wurde auf solchen Platten in 12 bis 18 Stunden quantitativ zum Ketodien abgebaut [115]. Bei den hier beschriebenen Versuchen vergingen zwischen Probenauftrag und Anfärbung kaum 30 Minuten. Die Untersuchung von Membranphospholipiden auf Hydr(oper)oxifettsäuren

setzt dagegen die Trennung der Phospholipide voraus, die nach eigener Erfahrung (nicht beschriebene Versuche) mit zweidimensionaler Dünnschichtchromatographie mindestens 3 Stunden dauert. Genaue Ergebnisse sind nach diesem Schritt nicht mehr zu erwarten.

Die Nachweisgrenze für das Zinzadze-Reagenz auf Phospholipide liegt bei etwa 5 µg Phospholipid auf herkömmlichen Platten [106]. Beim geringen Substanzbedarf (Submikrogrammengen) der HPDC-Methode wurde jeweils die maximal mögliche Menge von etwa 4 µg Phospholipid (2% des 1-ml-Lipidansatzes) aufgetragen. Da Cardiolipin 2 Fettsäuren in β-Position enthält, entsteht bei der enzymatischen Hydrolyse zunächst Mono- und dann Dilysocardiolipin. Bei einer Lipidbande (s. Abbildung 5, S. 39, Stufen V und VI) war der Phospholipidnachweis nicht eindeutig. Eine eindeutige Aussage über die quantitative Hydrolyse zum Dilysocardiolipin ist deshalb nicht möglich. Die Hauptaussage des Versuches (s.u.) ist hierdurch nicht beeinträchtigt.

Die wesentlich empfindlichere Jodfärbung zeigte zum einen die Inhomogenität der verwendeten Phospholipide (vgl. Abbildungen 4 und 5, jeweils letzte Probe), obwohl diese praktisch frei von Nicht-Phospholipid-Lipiden waren (s. 4.5.). Vielleicht sind hier Zersetzungsprodukte zu sehen; die Phospholipide waren ab Hersteller in Chloroform gelöst (vgl. 5.3.). Zum zweiten ließ sich auch durch Jodfärbung nach Phospholipasebehandlung kein Lecithin bzw. Cardiolipin mehr nachweisen (vgl. Abbildungen 4 und 5, Probe V), d.h. der Phospholipase-Umsatz war - zumindest auf der 1.Stufe (s.o.) - vollständig.

Die Hauptaussage des Versuches folgt aus dem Vergleich der Proben IV und V (s. Abbildungen 4 und 5): Die Kaliumjodid-Stärke-Reaktion, die als der empfindlichste Hydroperoxidnachweis auf Dünnschichtplatten gilt [125], war erst nach der Phospholipase-Behandlung negativ. Da GSH-Px nach dem jetzigen Kenntnisstand nur mit Hydroperoxiden reagiert, lassen sich aus dem Befund folgende qualitative Schlüsse ableiten:

1. Mit der Kaliumjodid-Stärke-Reaktion wurden Hydroperoxide angefärbt;
2. Hydroperoxide überstehen die Aufarbeitungsprozedur;
3. GSH-Px reagiert zumindest bevorzugt mit freien Hydroperoxifettsäuren.

5.5. Ansätze zur Prüfung Lipoxigenase-behandelter Lipide auf ihre Substrateigenschaft für Glutathionperoxidase

5.5.1. Methodisches

5.5.1.1. Phospholipiddispersionen in wäßrigen Systemen

Lecithin und Cardiolipin ließen sich problemlos in B-Puffer aufnehmen und bildeten eine über mehrere Tage stabile Dispersion. Die physikalische Struktur dieser Dispersionen ist für die Interpretation der Ergebnisse und für ihre Übertragbarkeit auf Biomembranen von allergrößter Bedeutung.

In Biomembranen ist das Lipid-Doppelschicht-Modell als Membrangrundstruktur anerkannt [126]. Die meisten Phospholipid-Wasser-Systeme bestehen ebenfalls aus Lipid-Doppelschichten [127-131]. Die im Inneren dieser Doppelschicht befindlichen Fettsäureketten sind im Falle von z.B. Linolsäure bei Raumtemperatur frei beweglich. Außen befindet sich auf beiden Schichtseiten ein Wasserfilm definierter Dicke, an den sich immer abwechselnd beliebig viele Lipid-Wasser-Schichten anschließen. Der Gesamtwassergehalt dieser lamellaren Struktur hängt von verschiedenen Faktoren ab; er liegt bei etwa 50%. Cardiolipin wird im Gegensatz zu Lecithin durch Calciumionen ausgefällt. Dabei bildet es eine hexagonale Struktur mit geringerem Wassergehalt aus [128,130]. In beiden Strukturen ist die Anordnung der Phospholipide mit der in der Biomembran-Doppelschicht identisch, sodaß sie - von den Dimensionen des Wasserraumes abgesehen - beide als Modell für Biomembranen herangezogen werden dürfen [130].

Über die Dimensionen des Wasserraumes sind keine Angaben möglich. Der Lipoxigenase-Umsatz macht jedoch deutlich, daß er für dieses relativ große Protein (100 000 D, keine Untereinheiten) zugänglich ist.

5.5.1.2. Lipidhydroperoxidierung

Die nichtenzymatische Peroxidierung von Lipiden dauert lange, führt zu vielen Nebenprodukten und liefert kaum mehr als 10% Hydroperoxid [76]. Die hier versuchte enzymatische Hydroperoxidierung führte selbst bei der niederen Substratkonzentration im Stundenbereich zu etwa 20% Umsatz. Die HPDC zeigte Banden ohne jedes tailing, d.h. intermolekulare Reaktionen fanden nicht statt. Allerdings haben Lipoxigenasen verschiedene Nebenaktivitäten, durch die Hydroperoxide abgebaut werden können [99,133]. Eine Trennung von hydroperoxidiertem und unumgesetztem Phospholipid durch das verwendete Laufmittel war nicht zu erwarten [125].

5.5.1.3. Lipoxigenase-Inaktivierung

Lipoxigenase wird durch H_2O_2 schnell und irreversibel gehemmt [133]. Dieses Reagenz hätte jedoch den GSH-Px-Test gestört. Katalase sollte nicht zugesetzt werden, da Hämoproteine allgemein als Peroxidasen reagieren und deshalb bei der Analytik gestört hätten (vgl. Lit. 6). Die zweiminütige Hitzebehandlung wurde als Ausweg gewählt, da eine vollständige Zersetzung von Hydroperoxilinolsäure erst nach dreistündigem Kochen beobachtet wurde [134].

5.5.1.4. Phospholipase-Behandlung

Phospholipasen werden durch die Grenzfläche aktiviert, die von ihnen zerstört wird [68,135]. Quantitativer Umsatz von Phospholipiden wurde deshalb bisher nur von wenigen Autoren beobachtet [69,111,136-142].

Phospholipasen A sind absolut positions- und stereospezifisch [68]. Die Pankreas-Phospholipase A_2 zeigt im Gegensatz zu anderen Phospholipasen A_2 keine Bevorzugung bestimmter Fettsäuren [110,111]. Dies ist wegen des nachhaltigen Einflusses einer Hydr(oper)oxigruppe auf die Eigenschaften einer Fettsäure von besonderer Bedeutung. Außerdem wurde bisher nur mit dieser Phospholipase ein vollständiger Umsatz aller gängigen Phospho-

lipide beobachtet [110,111,141; W.Fischer, persönliche Mitteilung (1982); vgl. Lit. 69]. Der offensichtlich vollständige Umsatz beider Phospholipide innerhalb von 20 Minuten ließ sich mit viel Enzym bei niederen Kosten erzielen.

Mit radikalisch peroxidierten Phospholipiden ist ein so glatter Phospholipase-Umsatz weniger wahrscheinlich: Für sehr verschiedene Proteine ist die kovalente Bindung an peroxidierte Phospholipide beschrieben [143]; charakterisierte Nebenprodukte der Lecithin-Oxidation hemmten Schlangengift-Phospholipase [144]; aus peroxidierten Mikrosomenmembranen waren ungesättigte wie gesättigte Fettsäuren nicht mehr vollständig extrahierbar, vermutlich wegen kovalenter Verknüpfung einzelner Fettsäureketten [145]. Lange vor diesen Befunden konnte McCAY [74] (s. 1.3.3.) aus einem ähnlichen System, dem er allerdings Leberzellsaft und GSH zugesetzt hatte, durch Phospholipasebehandlung keine Hydroxifettsäuren freisetzen. Er schloß hieraus, daß GSH-Px membrangebundene Hydroperoxide nicht reduziert.

5.5.2. Ansätze mit Linolsäure

Der Umsatz von Linolsäure zu Hydroperoxilinolsäure durch Lipoxigenase ist allgemein akzeptiert [99,133]. Nebenreaktionen unter anaeroben Bedingungen [133] wurden durch niedere Linolsäurekonzentration (0,23 mM bei 0,25 mM Sauerstoff) vermieden; Nebenreaktionen durch Isoenzyme der Lipoxigenase unter aeroben Bedingungen, z.B. Ketodienbildung [99,133], waren spektral (vgl. Abbildung 2, S. 34) nicht zu erkennen. Die langwelligen UV-Absorptionen im Spektrum der Linolsäure (s. Abbildung 2) sind denen eines Triens (vgl. Lit. 112) sehr ähnlich.

Die Reduktion von Hydroperoxilinolsäure mit GSH-Px liefert nach den Untersuchungen von AOSHIMA [117] und vor allem CHRISTOPHERSEN [115] eindeutig die entsprechende Hydroxilinolsäure. Die Identität der UV-Spektren beider Linolsäurederivate entspricht Literaturdaten [112].

Die Lipoxigenase-Reaktion läßt sich also über Sauerstoffverbrauch, Dienbildung und qualitativ über die positive Kalium-

jodid-Stärke-Reaktion nach HPDC (s. Abbildung 4, S. 38, Probe 2) verfolgen. Die GSH-Px-Aktivität ist am NADPH-Verbrauch im gekoppelten Test und qualitativ an der wieder negativen Kaliumjodid-Stärke-Reaktion (s. Abbildung 4, Probe 3) erkennbar. Hiermit stehen für die Beurteilung der Reaktivität beider Enzyme mit (Hydroperoxi-)-Phospholipiden ausreichende Kriterien zur Verfügung.

5.5.3. Ansätze mit Phospholipiden

5.5.3.1. Hydroperoxidierung der Phospholipide

Sauerstoffverbrauch, Dienbildung und positive Kaliumjodid-Stärke-Reaktion nach HPDC (vgl. Abbildungen und Tabellen auf S. 38/39) lassen den Schluß zu, daß bei der Lipoxigenase-Behandlung beider Phospholipide Hydroperoxide gebildet wurden. Ein echter Nachweis (z.B. durch gekoppelte Gaschromatographie und Massenspektrometrie) wurde nicht erbracht.

5.5.3.2. Behandlung hydroperoxidierter Phospholipide mit Glutathionperoxidase

Die Ergebnisse mit ungekochten und gekochten Ansätzen zeigen gleichermaßen, daß enzymatisch hydroperoxidierte Phospholipide durch Glutathionperoxidase nicht reduziert werden. In diesem Zusammenhang verdient der Befund, daß der spontane NADPH-Verbrauch in Gegenwart von GSH und hydroperoxidiertem Lecithin durch GSH-Px-Zugabe nicht beeinflußt wird, besondere Beachtung (s. Abbildung 3, S. 36). Dies bedeutet, daß die Umsatzgeschwindigkeit der GSH-Px mit diesem Hydroperoxid mindestens um einen Faktor 1000 unter der mit anderen Hydroperoxiden liegt. Sie ist damit auch deutlich niedriger als die der Lipoxigenase mit Lecithin bei Reaktionsabbruch (s. Abbildung 3).

Da GSH-Px mit Fettsäurehydroperoxiden reagiert und auch deren einfache Ester umsetzt [6,76], handelt es sich hier wohl um ein Problem der Zugänglichkeit des Substrates: RICHTER (persönliche Mitteilung, 1983) konnte zeigen, daß Rindererythrozyten-GSH-Px mit verschiedenen künstlichen und Bio-Membranen interagiert, aber nicht in diese eindringen kann, d.h. der

Hydrophobe Innenraum der Membran ist für dieses Enzym nicht zugänglich. Diese Interaktion wurde durch Fluoreszenzpolarisationsuntersuchungen mit Eosin-markiertem, aktiven Enzym als sehr schnelle Rollbewegung auf der Membran charakterisiert. Eine derart schnelle Rollbewegung wäre in der Membran nicht möglich. Andererseits ist noch nicht genau bekannt, ob sich hydroperoxidierte Fettsäurereste im Inneren der Membran befinden oder von dieser ausgeschlossen werden. Wegen der Interaktionsfähigkeit des Enzyms mit Membranen und wegen der Zugänglichkeit des Wasserraumes in der Phospholipidstruktur (s. 5.5.1.1.) für das größere Lipoxigenasemolekül ist es immerhin wahrscheinlich, daß auch GSH-Px in diesen Wasserraum eindringen kann.

5.5.3.3. Phospholipase-Behandlung der hydroperoxidierten Phospholipide

Die Ergebnisse (s. Abbildungen und Tabellen S. 36-39) zeigen eindeutig, daß die Phospholipase mindestens 1 Fettsäureester je Phospholipidmolekül hydrolysierte (vgl. 5.4.) und daß erst durch Phospholipase-Behandlung ein GSH-Px-abhängiger NADPH-Verbrauch zu erzielen war. Offensichtlich wird durch Phospholipase-Behandlung Hydroperoxilinolsäure freigesetzt. Allerdings sind die gemessenen Umsätze nicht stöchiometrisch, d.h. Sauerstoffverbrauch, Dienbildung und NADPH-Verbrauch stimmen nicht überein. Diese Unstimmigkeiten lassen sich mit Aufarbeitungsverlusten und Nebenaktivitäten im Lipoxigenase-Präparat (vgl. 5.2.1.) erklären. Die Schwierigkeiten bei der Auswertung des Cardiolipinansatzes sind auf die Ausfällung dieses Phospholipids durch Calciumionen zurückzuführen (vgl. 5.5.1.1.).

Trotz der Probleme ist die Aussage dieses Kontrollversuches eindeutig: Die hydroperoxidierten Phospholipide enthielten Hydroperoxide.

5.5.3.4. Lipoxigenase-Behandlung der Phospholipase-behandelten Phospholipide

Dieser Ansatz sollte zeigen, ob verbliebene Linolsäure(ester)

hydroperoxidiert und anschließend reduziert werden können. Über 80% der eingesetzten Linolsäureester (vgl. Tabellen 7 und 8) wurden insgesamt ins Dien umgewandelt, der NADPH-Verbrauch war aber weit geringer. Trotzdem war nach der HPDC der Kaliumjodid-Stärke-Nachweis auf Hydroperoxide negativ. Diese Diskrepanz konnte nicht geklärt werden; NADPH stand noch reichlich zur Verfügung, wie nach t-BHP-Zugabe (s. Abbildung 3) zu sehen war.

5.5.4. Ansatz eines kontinuierlichen photometrischen Phospholipase-A_2-Tests

Die Ergebnisse dieser Versuche zeigen, daß nebeneinander Phospholipase A_2, Lipoxigenase, Glutathionperoxidase und Glutathionreduktase aktiv sind. Deshalb bietet sich der Ansatz eines gekoppelten Tests für die kontinuierliche photometrische Bestimmung von Phospholipase A_2 mit natürlichen Substraten an. Kontinuierlich ließ sich dieses Enzym bisher nur über die pH-Änderung in ungepufferten Systemen durch die freigesetzten Fettsäuren [146] oder polarographisch durch Kopplung der Reaktion mit Lipoxigenase [147] untersuchen. Die Messung über die pH-Änderung ist sehr unempfindlich, die Substratanalogen sind nicht käuflich erwerbbar und haben schlechte Substrateigenschaft [146]. Der polarographische Test ist durch die Verfügbarkeit des Gerätes limitiert. Ob der photometrische Test tatsächlich durchführbar und dann dem polarographischen Test überlegen ist, wurde noch nicht weiter untersucht.

5.6. Glutathionperoxidase als Membranschutzfaktor

Die hier vorgestellten Versuche zeigen, daß GSH-Px veresterte Hydroperoxifettsäuren in Modellmembranen nicht angreift. Es besteht zwar keine Gewißheit, daß die gesamte Membranaußenfläche für GSH-Px zugänglich war, aber es ist sehr wahrscheinlich, daß GSH-Px nicht in die Membran eindringen kann (s. 5.5.3.2.). Der Ort, an dem die Hydroperoxide zu erwarten sind, also das Membraninnere, ist demnach für dieses Enzym unzu-

gänglich. Ein Umsatz von Hydroperoxiden in Biomembranen durch dieses Enzym ist daher ebenfalls sehr unwahrscheinlich (s. 5. 5.1.1.). Die in der Einleitung beschriebene Membranschutzwirkung der GSH-Px konnte in ihrer Natur durch die beschriebenen Versuche nicht geklärt werden, die Hypothese der direkten Reduktion von Membranhydroperoxiden wurde dagegen weitgehend widerlegt.

Zur Erklärung der Membranschutzwirkung ist gut vorstellbar, daß auch in vivo eine Phospholipase-Aktivität Voraussetzung für die Reduktion von Hydroperoxiden durch GSH-Px ist. Die Schädlichkeit von Hydroperoxifettsäuren für Cytosol und Membranen ist in der Einleitung beschrieben. Es ist aber nicht auszuschließen, daß das gewählte Modellsystem reiner Phospholipidmembranen ungeeignet für die Beurteilung der GSH-Px-Aktvität mit Biomembranen ist. Weiterhin ist denkbar, daß der GSH-Px an der Membran eine weitere, noch völlig unbekannte Funktion zukommt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wird ein Präparationsschema vorgestellt, das die 6 000-fache Anreicherung von Glutathionperoxidase aus Rindererythrozyten bis zur Homogenität (600 U/mg) in ein bis zwei Wochen bei 50% Ausbeute ermöglicht.

2. Es wird gezeigt, daß Dilinoleoyllecithin und Rinderherz-Cardiolipin enzymatisch mit Lipoxigenase aus Sojabohnen hydroperoxidiert werden können.

3. Es werden Reaktionsbedingungen aufgezeigt, bei denen Pankreas-Phospholipase A_2 in wäßrigem System dispergiertes Lecithin quantitativ in Lysolecithin und Cardiolipin vollständig in Mono- oder Dilysocardiolipin umsetzt.

4. Die enzymatisch hydroperoxidierten Phospholipide werden in wäßriger Dispersion von Glutathionperoxidase nicht umgesetzt. Erst die aus diesen Phospholipiden mit Phospholipase freigesetzte Hydroperoxilinolsäure wird von Glutathionperoxidase reduziert.

5. Es wird nachgewiesen, daß Lysolecithin und Hydroperoxilinolsäure mit Butanol, nicht aber mit Chloroform aus einer wäßrigen Phase extrahiert werden können.

6. Die gleichzeitige Reaktivität der Enzyme Lipoxigenase, Glutathionperoxidase, Glutathionreduktase und Phospholipase A_2 in einem Testansatz eröffnet erstmals die Möglichkeit eines kontinuierlich registrierbaren photometrischen Phospholipase-A-Tests mit natürlichen Substraten.

7. Es wird diskutiert, daß aufgrund der Ergebnisse des Modellversuches Glutathionperoxidase auch membrangebundene Hydroperoxifettsäuren nicht umsetzen kann und deshalb ihre Membranschutzwirkung auf andere Weise ausübt.

L I T E R A T U R

[1] Mills,G.C. (1957), J.Biol.Chem. 229, 189-197.

[2] Mills,G.C., Randall,H.P. (1958), J.Biol.Chem. 232, 589-598.

[3] Schwarz,K., Foltz,C.M. (1957), J.Amer.Chem.Soc. 79, 3292-3293.

[4] Scott,M.L., Bieri,J.G., Briggs,G.M., Schwarz,K. (1957), Poult Sci. 36, 1155.

[5] Tappel,A.L. (1965), Fed.Proc. 24, 73-78.

[6] Little,C., O'Brien,P.J. (1968), Biochem.Biophys.Res.Commun. 31, 145-150.

[7] Thompson,J.N., Scott,M.L. (1969), J.Nutr. 97, 335-342.

[8] McCoy,K.E.M., Weswig,P.H. (1969), J.Nutr. 98, 383-389.

[9] Rotruck,J.T., Hoekstra,W.G., Pope,A.L. (1971), Nature New Biol. 231, 223-224.

[10] Rotruck,J.T., Pope,A.L., Ganther,H.E., Hoekstra,W.G. (1972), J.Nutr. 102, 689-696.

[11] Rotruck,J.T., Pope,A.L., Ganther,H.E., Swanson,A.B. (1973), Science 179, 588-590.

[12] Flohé,L., Günzler,W.A., Schock,H.H. (1973), FEBS Lett. 32, 132-134.

[13] Forstrom,J.W., Zakowski,J.J., Tappel,A.L. (1978), Biochem. 17, 2639-2644.

[14] Wendel,A., Kerner,B., Graupe,K. (1978) in: "Functions of Glutatione in Liver and Kidney" (Sies,H. and Wendel,A., Hrsg.), Proc.Life Sci., S. 107-113, Springer, Berlin.

[15] Ganther,H.E., Kraus,J.R. (1981) in: "Selenium in Biology and Medicine" (Spallholz,J.E., Martin,J.L., Ganther,H.E., Hrsg.), S. 54-69, AVI Publishing Company, Westport, Connecticut.

[16] Wendel,A. (1980) in: "Enzymatic Basis of Detoxication" (Jakoby,W.B., Hrsg.), Bd.I, S. 333-353, Academic Press, New York.

[17] Lawrence,R.A., Burk,R.F. (1978), J.Nutr. 108, 211-215.

[18] Green,R.C., O'Brien,P.J. (1970),
Biochim.Biophys.Acta. 197, 31-39.

[19] Flohé,L., Schlegel,W. (1971),
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 352, 1401-1410.

[20] Flohé,L., Günzler,W.A., Jung,G., Schaich,E., Schneider,F.
(1971), Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 352, 159-169.

[21] Little,C. (1972), Biochim.Biophys.Acta 284, 375-381.

[22] Flohé,L., Günzler,W.A. (1974) in: "Glutathione"
(Flohé,L., Benöhr,H.C., Sies,H., Waller,H.D., Wendel,A.,
Hrsg.), S. 132-145, Thieme, Stuttgart.

[23] Sies,H., Wendel,A., Bors,W. (1982) in: "Metabolic Basis
of Detoxication" (Jakoby,W.B., Bend,J.R., Caldwell,J.,
Hrsg.), S. 307-321, Academic Press, New York.

[24] Flohé,L., Eisele,B., Wendel,A. (1971),
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 352, 151-158.

[25] Grossmann,A. (1979), Biochemische Diplomarbeit, Tübingen.

[26] Ladenstein,R., Epp,O., Bartels,K., Jones,A., Huber,R.,
Wendel,A. (1979), J.Mol.Biol. 134, 199-218.

[27] Flohé,L., Loschen,G., Günzler,W.A., Eichele,E. (1972),
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 987-999.

[28] Günzler,W.A., Vergin,H., Müller,I., Flohé,L. (1972),
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 1001-1004.

[29] Forstrom,J.W., Stults,F.H., Tappel,A.L. (1979),
Arch.Biochem.Biophys. 193, 51-55.

[30] Little,C., Olinescu,R., Reid,K.G., O'Brien,P.J. (1970),
J.Biol.Chem. 245, 3632-3636.

[31] Morissey,P., O'Brien,P.J. (1980),
Can.J.Biochem. 58, 1012-1017.

[32] Sies,H. (1974), Angew.Chem. 86, 789-801.

[33] Chance,B., Sies,H., Boveris,A. (1979),
Physiol.Rev. 59, 527-605.

[34] Ramasarma,T. (1982), Biochim.Biophys.Acta 694, 69-93.

[35] Azzi,A., Loschen,G., Flohé,L. (1974) in: "Glutathione"
(Flohé,L., Benöhr,H.C., Sies,H., Waller,H.D., Wendel,A.,
Hrsg.), S. 237-242, Thieme, Stuttgart.

[36] Zimmermann,R., Flohé,L., Weser,U., Hartmann,H.J. (1973), FEBS Lett. 29, 117-120.

[37] Jones,D.P., Eklöw,L., Thor,H., Orrhenius,S. (1981), Arch.Biochem.Biophys. 210, 505-516.

[38] Oshino,N., Chance,B., Sies,H., Bücher,T. (1973) Arch.Biochem.Biophys. 154, 117-131.

[39] May,J.M. (1981), Arch.Biochem.Biophys. 207, 117-127.

[40] Eggleston,L.V., Krebs,H.A. (1974), Biochem.J. 138, 425-435.

[41] Mukherjee,S.P., Lynn,W.S. (1977), Arch.Biochem.Biophys. 184, 69-76.

[42] Flohé,L. (1979) in: "Oxygen Free Radicals and Tissue Damage", Ciba Foundation Symposium 65 (New Series), S. 95-122, Excerpta Medica, Amsterdam.

[43] Aebi,H., Suter,H. (1974) in: "Glutathione" (Flohé,L., Benöhr,H.C., Sies,H., Waller,H.D., Wendel,A., Hrsg.), S. 192-201, Thieme, Stuttgart.

[44] Srivastava,S.K., Awasthi,Y.S., Beutler,E. (1974), Biochem.J. 139, 289-295.

[45] Sies,H., Summer,K.H. (1975), Eur.J.Biochem. 57, 503-512.

[46] Sies,H., Grosskopf,M. (1975), Eur.J.Biochem. 57, 513-520.

[47] Shimasaki,H., Privett,O.S. (1975), Arch.Biochem.Biophys. 169, 506-512.

[48] Little,C., O'Brien,P.J. (1967), Biochem.J. 103, 29p-30p.

[49] Little,C., O'Brien,P.J. (1966), Biochem.J. 101, 13p.

[50] Green,R.C., Little,C., O'Brien,P.J. (1971), Arch.Biochem.Biophys. 142, 598-605.

[51] Chow,C.K., Tappel,A.L. (1974), J.Nutr. 194, 444-451.

[52] Lawrence,R.A., Burk,R.F. (1976), Biochem.Biophys.Res.Commun. 71, 952-958.

[53] Prohaska,J.R., Ganther,H.E. (1977), Biochem.Biophys.Res.Commun. 76, 437-445.

[54] Jakoby,W.B., Ketley,J.N., Habig,W.H. (1976) in: "Glutathione: Metabolism and Function" (Arias,I.M., Jakoby,W.B., Hrsg.), S. 213-223, Raven Press, New York.

[55] Jakoby,W.B., Habig,W.H. (1980) in: "Enzymatic Basis of Detoxication" (Jakoby,W.B., Hrsg.), Bd.II, S. 63-94, Academic Press, New York.

[56] Lawrence,R.A., Parkhill,L.K., Burk,R.F. (1978), J.Nutr. 108, 981-987.

[57] Cikryt,P., Feuerstein,S., Wendel,A. (1982), Biochem.Pharmacol. 31, 2873-2877.

[58] Shreve,M.R., Morissey,P.G., O'Brien,P.J. (1979), Biochem.J. 177, 761-763.

[59] Flohé,L. (1982) in: "Free Radicals in Biology" (Pryor,W.A., Hrsg.), Bd.V, S. 223-254, Academic Press, New York.

[60] Witting,L.A. (1980) in: "Free Radicals in Biology" (Pryor,W.A., Hrsg.), Bd.IV, S. 295-319, Academic Press, New York.

[61] Roubal,W.T., Tappel,A.L. (1966), Arch.Biochem.Biophys. 113, 150-155.

[62] Chio,K.S., Tappel,A.L. (1969), Biochem. 8, 2827-2832.

[63] Tappel,A.L. (1973), Fed.Proc. 32, 1870-1874.

[64] van den Bosch,H. (1980), Biochim.Biophys.Acta 604, 191-246.

[65] Yasuda,M., Fujita,T. (1977), Japan.J.Pharmacol. 27, 429-435.

[66] Pappu,A.S., Fatterpaker,P., Sreenivasan,A. (1978), Biochem.J. 172, 349-352.

[67] Sevanian,A., Stein,R.A., Mead,J.F. (1981), Lipids 16, 781-789.

[68] Verheij,H.M., Slotboom,A.J., de Haas,G.H. (1981), Rev.Physiol.Biochem.Pharmacol. 91, 91-203.

[69] Pfeiffer,D.R., Schmid,P.C., Beatrice,M.C., Schmid,H.O. (1979), J.Biol.Chem. 254, 11485-11494.

[70] de Winter,J.M., Vianen,G.M., van den Bosch,H. (1982), Biochim.Biophys.Acta 712, 332-341.

[71] Taylor,C.B., Bailey,E., Bartley,W. (1967), Biochem.J. 105, 605-609.

[72] Gurr,M.I., Prottey,C., Hawthorne,J.N. (1965), Biochim.Biophys.Acta 106, 357-370.

[73] Vladimirov,Y.A., Olenev,V.I., Suslova,T.B., Cheremisina, Z.P. (1980), Adv.Lipid Res. 17, 173-249.

[74] McCay,P.B., Gibson,D.D., Fong,K.L., Hornbrook,K.R. (1976) Biochim.Biophys.Acta 431, 459-468.

[75] Tappel,A.L. (1980) in: "Free Radicals in Biology" (Pryor,W.A., Hrsg.), S. 1-47, Academic Press, New York.

[76] Hinkeldey,K. (1981), Biochemische Diplomarbeit, Tübingen.

[77] Mitchell,J.R., Corcoran,G.B., Smith,C.V., Hughes,H., Lauterburg,B.H. (1981), in: "Biological reactive Intermediates" (Snyder,R., Parke,D.V., Kocsis,J.J., Jollow,D.J., Gibson,C.G., Witmer,C.M., Hrsg.) Bd.II, S. 199-219, Plenum Press, New York.

[78] Talcott,R.E., Denk,H., Eckerstorfer,R., Schenkman,J.B. (1976), Chem.Biol.Interact. 12, 355-361.

[79] Burk,R.F., Trumble,M.J., Lawrence,R.A. (1980), Biochim.Biophys.Acta 618, 35-41.

[80] Ursini,F., Maiorino,M., Valente,M., Ferri,L., Gregolin,C. (1982), Biochim.Biophys.Acta 710, 197-211.

[81] Maiorino,M., Ursini,F., Leonelli,M., Finato,N., Gregolin,C. (1982), Biochem.Int. 5, 575-583.

[82] McCay,P.B., Gibson,D.D., Hornbrook,K.R. (1981), Fed.Proc. 40, 199-205.

[83] Gibson,D.D., Hornbrook,K.R., McCay,P.B. (1980), Biochim.Biophys.Acta 620, 572-582.

[84] Burk,R.F. (1982), Biochem.Pharmacol. 31, 601-602.

[85] Burk,R.F. (1983), Biochim.Biophys.Acta, im Druck.

[86] Spallholz,J.E., Martin,J.L., Ganther,H.E. (Hrsg., 1981) "Selenium in Biology and Medicine", AVI Publishing Company, Westport, Connecticut.

[87] Herrman,J.L. (1977), Biochim.Biophys.Acta 500, 61-70.

[88] Beilstein,M.A., Tripp,M.J., Whanger,P.D. (1981), J.Inorg.Biochem. 15, 339-347.

[89] Burk,R.F., Gregory,P.E. (1982), Arch.Biochem.Biophys. 213, 73-80.

[90] Burk,R.F., Lawrence,R.A., Lane,J.M. (1980), J.Clin.Invest. 65, 1024-1031.

[91] Flohé,L., Zimmermann,R. (1974) in: "Glutathione" (Flohé,L., Benöhr,C.H., Sies,H., Waller,H.D., Wendel,A., Hrsg.), S. 245-260, Thieme, Stuttgart.

[92] Zimmermann,R. (1973), Biochemische Diplomarbeit, Tübingen.

[93] Günzler,W.A., Kremers,H., Flohé,L. (1974), Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 12, 444-448.

[94] Wendel,A. (1981), Meth.Enzymol. 77, 325-333.

[95] Kalckar,H.M. (1947), J.Biol.Chem. 167, 461-475.

[96] Laemmli,U.K. (1970), Nature 227, 680-685.

[97] Fairbanks,G., Steck,T.L., Wallach,D.F.H. (1971), Biochem. 10, 2606-2617.

[98] Weser,U., Gärtner,A., Sellinger,K.H. (1982), Biochem. 21, 6133-6137.

[99] Axelrod,B., Cheesbrough,T.M., Laakso,S. (1981), Meth.Enzymol. 71, 441-451.

[100] Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L., Randall,R.J. (1951), J.Biol.Chem. 193, 265-275.

[101] Bartlett,G.R. (1959), J.Biol.Chem. 234, 466-468.

[102] Fiske,S.H., Subbarow,Y. (1925), J.Biol.Chem. 66, 375-400.

[103] Rose,H.G. (1964), Biochim.Biophys.Acta 84, 109-127.

[104] Tappel,A.L. (1963) in: "The Enzymes", 2.Ed. (Boyer,P.D., Lardy,H., Myrbäck,K., Hrsg.), Bd.8, S. 275-283, Academic Press, New York.

[105] Feuerstein,S. (1981), Biochemische Dissertation, Tübingen.

[106] Dittmer,J.C., Lester,R.L. (1964), J.Lipid Res. 5, 126-127.

[107] Zöllner,N., Wolfram,G. (1962), Klin.Wschr. 40, 1101-1107.

[108] Skipski,V.P., Peterson,R.F., Barclay,M. (1964), Biochem.J. 90, 374-378.

[109] Bergmeyer,H.U. (1975), Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 13, 507-508.

[110] van Deenen,L.L.M., de Haas,G.H., Heemskerk,C.H.T. (1963), Biochim.Biophys.Acta 67, 295-304.

[111] de Haas,G.H., Postema,N.M., Nieuwenhuizen,W., van Deenen,L.L.M. (1968) Biochim.Biophys.Acta 159, 103-117.

[112] Vioque,E., Holman,R.T. (1962), Arch.Biochem.Biophys. 99, 522-528.

[113] Lödige,W. (1979), Biochemische Diplomarbeit, Tübingen.

[114] Christopher,J., Pistorius,E., Axelrod,B. (1970), Biochim.Biophys.Acta 198, 12-19.

[115] Christophersen,B.O. (1968), Biochim.Biophys.Acta 164, 35-46.

[116] Massey,V., Williams,C.H.Jr. (1965), J.Biol.Chem. 240, 4470-4480.

[117] Aoshima,H. (1978), Analyt.Biochem. 87, 49-55.

[118] Bjerve,K.S., Daae,L.N.W., Bremer,J. (1974), Analyt.Biochem. 58, 238-245.

[119] Schmid,P., Hunter,E., Calvert,J. (1973), Physiol.Chem.Phys. 5, 151-155.

[120] Husek,P., Kralikova,M., Felt,V. (1973), Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 11, 509-512.

[121] Dole,V.P., Meinertz,H. (1960), J.Biol.Chem. 235, 2595-2599.

[122] Nielsen,H. (1971), Biochim.Biophys.Acta 231, 370-384.

[123] Stahl,E., (1967), "Dünnschichtchromatographie", 2. Aufl., Springer, Berlin.

[124] Slawson,V., Adamson,A.W., Mead,J.F. (1973), Lipids, 8, 129-134.

[125] Oette,K. (1965), J.Lipid Res. 6, 449-454.

[126] Robertson,J.D. (1981), J.Cell Biol. 91, 189s-204s.

[127] Chapman,D., Leslie,R.B. (1970) in: "Membranes of Mitochondria and Chloroplasts" (Racker,E., Hrsg.), S. 91-126, van Nostrand Reinhold Company, New York.

[128] Rand,R.P., Sengupta,S. (1972),
Biochim.Biophys.Acta 255, 484-492.

[129] Phillips,M.C. (1972),
Progr.Surf.Membr.Sci. 5, 139-221.

[130] Boggs,J.M., Hsia,J.C. (1973),
Proc.Nat.Acad.Sci. 70, 1406-1409.

[131] Hauser,H., Phillips,M.C. (1979),
Progr.Surf.Membr.Sci. 13, 297-413.

[132] Ioannou,P.V., Golding,B.T. (1979),
Progr.Lipid Res. 17, 279-318.

[133] Veldink,G.A., Vliegenthart,J.F.G., Boldingh,J.
(1977), Progr.Chem.Fats other Lipids 15, 131-166.

[134] Hamberg,M., Gotthammar,B. (1973),
Lipids 8, 737-744.

[135] Verger,R., de Haas,G.H. (1976),
Annu.Rev.Biophys.Bioeng. 5, 77-117.

[136] Rimon,A., Shapiro,B. (1959),
Biochem.J. 71, 620-623.

[137] Rathbone,L., Magee,W.L., Thompson,R.H.S. (1962),
Biochem.J. 83, 498-502.

[138] Okuyama,H., Nojima,S. (1965),
J.Biochem. 57, 529-538.

[139] Wood,R., Harlow,R.D. (1969),
Arch.Biochem.Biophys. 135, 272-281.

[140] Rosenthal,A.F., Han,S.C.H. (1970),
Biochim.Biophys.Acta 218, 213-220.

[141] Fischer,W. (1977),
Biochim.Biophys.Acta 487, 74-88.

[142] Upreti, G.C., Jain,M.K. (1978),
Arch.Biochem.Biophys. 188, 364-375.

[143] Nielsen,H. (1981), Lipids 16, 215-222.

[144] Yamaguchi,K., Nakamura,T., Toyomizu,M. (1981),
Chem.Abstr. 95, 199 631 w.

[145] Eichenberger,K., Böhni,P., Winterhalter,K.H., Kawato,S.,
Richter,C. (1982), FEBS Lett. 142, 59-62.

[146] Van den Bosch,H., Aarsman,A.J. (1979),
Agents Actions 9, 382-389.

[147] Gale,P.H., Egan,R.W. (1980),
Analyt.Biochem. 104, 489-493.

L E B E N S L A U F

Am 17. November 1952 wurde ich als Sohn des Anton Grossmann und seiner Ehefrau Imma, geb. Wilhelm, in Berlin geboren. Im April 1959 wurde ich in die Schweizerhof-Grundschule in Berlin - 37 eingeschult. Im April 1963 wechselte ich auf das Gymnasium Steglitz in Berlin - 41 über. Dort erlangte ich am 17. Januar 1972 die allgemeine Hochschulreife.

Im Sommersemester 1972 begann ich das Studium der Physiologischen Chemie und Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Von Oktober 1975 bis Oktober 1976 unterbrach ich mein Studium in Tübingen für einen Studienaufenthalt an der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Im Wintersemester 1977/78 bestand ich die mündliche Hauptprüfung. Von April 1978 bis Juni 1979 arbeitete ich im Physiologisch-chemischen Institut unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Wendel an meiner Diplomarbeit.

Von Juli 1979 bis März 1983 fertigte ich im Physiologisch-chemischen Institut ebenfalls unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. A. Wendel die vorliegende Dissertation "Reaktivität von Glutathionperoxidase mit Lipidhydroperoxiden" an.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie	G. Weitzel, U. Weser, D. Mecke, T. Bücher
Organische Chemie	Eu. Müller, E. Bayer
Anorganische Chemie	W. Rüdorff
Theoretische Chemie	F. F. Seelig
Physikalische Chemie	H. Mauser, W. Zeil
Anatomie	K. Mörike
Physik	H. Krüger
Mathematik	E. Pracht
Botanik	F. W. Bentrup
Zoologie	K. G. Grell
Histologie	M. Arnold
Physiologie	E. Betz
Pharmakologie	M. Siess
Toxikologie	H. Remmer, E. Pfaff
Mikrobiologie	V. Braun, H. Zähner
Pflanzenphysiologie	H. Metzner
Zoophysiologie	F. P. Möhres
Physikalische Biochemie	M. Klingenberg, K. Wegmann

ifo druck
laubanger 15
8600 bamberg
tel. 0951/64321